

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. M. Hertl
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Charakterisierung der adaptiven Autoimmunantwort
beim Pemphigus vulgaris**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Robert Pollmann
aus Lahnstein

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 20.08.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Rüdiger Eming

Korreferentin: Prof. Dr. Magdalena Huber

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
------------------------------	----------

Abbildungsverzeichnis	II
------------------------------	-----------

Tabellenverzeichnis	IV
----------------------------	-----------

1. Einleitung

1.1	Die Autoimmunerkrankung Pemphigus	1
1.2	Pemphigus vulgaris (PV) als häufigste Form des Pemphigus	1
1.2.1	Autoantikörper als entscheidendes Kriterium zur Diagnose des PV	3
1.2.2	Derzeitige Therapieoptionen zur Behandlung des PV	3
1.3	Die Immunpathogenese des PV	4
1.3.1	Die Rolle von Autoantikörpern gegen Desmoglein (Dsg)1 und Dsg3	4
1.3.2	Autoreaktive B-Zellen beim PV	6
1.3.3	Autoreaktive T-Zellen beim PV	7
1.4	T-Zell-vermittelte Induktion einer Antikörperantwort	8
1.4.1	T folliculäre Helfer (Tfh)-Zellen	8
1.4.2	Interleukin (IL)-21 und Tfh-Zellen im Kontext von Autoantikörper-vermittelter Autoimmunität	9
1.5	Zielsetzung	11

2. Material

2.1	Immortalisierte Zelllinien	12
2.2	Rekombinante Proteine	12
2.3	Antikörper	13
2.4	Zytokine	14
2.5	Chemikalien	15
2.6	Puffer und Kulturmedien	16
2.7	Verbrauchsmaterial	17
2.8	Geräte	17
2.9	Software	18

3. Methoden

3.1	Blutentnahmen	19
3.2	Separation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes mittels Dichtegradientenzentrifugation	19
3.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	20
3.4	Zellzahlbestimmung	21
3.5	Fluoreszenzmarkierung von rekombinanten Dsg3	21
3.6	Durchflusszytometrie	22
3.7	Detektion von IL-21-produzierenden autoreaktiven T-Zellen mittels enzyme-linked immunospot assay (ELISpot)	26

3.8	Kultivierung von murinen B-Zell-Hybridomzellen	27
3.9	Subklonierung von Hybridomzelllinien	28
3.10	Detektion Antikörpern und Zytokinen mittels <i>enzym-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	28
3.11	Statistik	29

4. Ergebnisse

4.1	Patientencharakteristik der untersuchten PV-Patienten	30
4.2	Untersuchung von IL-21 und Tfh-Zellen bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort von Patienten mit PV	32
4.2.1	Zytokinkonzentration von IL-4, IL-17 und IL-21 im Plasma von Patienten	32
4.2.2	IL-21 Plasmakonzentrationen im Krankheitsverlauf	33
4.2.3	IL-21 Produktion von stimulierten CD4 ⁺ T-Zellen bei PV-Patienten	34
4.2.4	Zytokinsekretion von IL-21-produzierenden T-Zellen	36
4.2.5	Bestimmung der IL-21 Produktion von Dsg3-spezifischen T-Zellen . . .	36
4.2.6	Untersuchung von zirkulierenden Tfh-Zellen bei PV-Patienten und Kontrollen	37
4.3	Entwicklung und Evaluation eines durchflusszytometrischen Testverfahrens zur Untersuchung von Dsg3-spezifischen B-Zellen	39
4.3.1	Generierung von murinen B-Zell Klonen als Positiv- und Negativkontrolle	39
4.3.2	Bestimmung der Sensitivität und Spezifität des Testsystems	41
4.4	Untersuchung von Dsg3-spezifischen B-Zellen bei Patienten mit PV	44
4.4.1	Analyse von Dsg3-spezifischen B-Zellen bei PV-Patienten und Kontrollen	45
4.4.2	Korrelation der Dsg3-spezifischer B-Zellen mit anti-Dsg3 Autoantikörpern	46
4.4.3	Einfluss von systemischen Therapien auf Dsg3-spezifische B-Zellen . .	46

5. Diskussion

5.1	Betrachtung der humoralen und zellulären Mechanismen im Kontext der adaptiven Autoimmunantwort des PV	48
5.2	Die Rolle von IL-21 bei der T-Zell-vermittelten Pathogenese des PV	49
5.2.1	Bedeutung von Zytokinen bei der Pathogenese des PV	49
5.2.2	IL-21-Plasmakonzentrationen im peripheren Blut von Patienten	49
5.2.3	Produktion von IL-21 durch CD4 ⁺ T-Zellen bei Patienten	50
5.2.4	IL-21 und Tfh-Zellen in der Immunpathogenese des Pemphigus	52
5.3	Querschnittsanalyse der identifizierten autoreaktiven B-Zell-Subpopulationen . .	54
5.3.1	Bedeutung von autoreaktiven B-Zellen bei der Pathogenese des PV . . .	54
5.3.2	Evaluation des durchflusszytometrischen Testverfahrens zur Detektion von Dsg3-spezifischen B-Zellen	54
5.3.3	Verteilung von Dsg3-spezifischen B-Zell-Subpopulationen bei Patienten mit PV	55
5.3.4	Vorkommen von autoreaktiven B-Zellen in anderen Kompartimenten . .	58
5.3.5	Dsg3-spezifische Gedächtnis B-Zellen im Kontext einer Rituximabtherapie	59
5.4	Fazit und Ausblick	62

6. Literaturverzeichnis	64
7. Zusammenfassung	80
8. Summary	82
9. Anhang	84
9.1 Tabellen	84
9.2 Schriftenverzeichnis	87
9.3 Verzeichnis akademischer Lehrer	90
9.4 Danksagung	91

Abkürzungsverzeichnis

AF647	Alexa Fluor 647
ALP	Alkaline Phosphatase
BP	bullöses Pemphigoid
bzw.	beziehungsweise
CD	engl. cluster of differentiation
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
Dsg1	Desmoglein 1
Dsg3	Desmoglein 3
ELISA	engl. enzym-linked immunosorbent assay
ELISpot	engl. enzym-linked immunospot assay
FACS	engl. fluorescence-activated cell sorting
FCS	engl. fetal calf serum
FSc	engl. forward scatter
g	mittlere Erdbeschleunigung
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRP	engl. horseradish peroxidase
ICOS	engl. inducible T cell costimulator
IgE	Immunglobulin Klasse E
IgG	Immunglobulin Klasse G
IL	Interleukin
Max.	Maximum
MHC	engl. major histocompatibility complex
Min.	Minimum
ml	Milliliter
OD	optische Dichte
PBMC	engl. peripheral blood mononuclear cells
PBS	engl. phosphat buffered saline
PD-1	engl. programmed cell death protein 1
PF	Pemphigus foliaceus
pH	lat. potentia Hydrogenii
PV	Pemphigus vulgaris
RA	rheumatoide Arthritis
RE	relative Einheiten
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SLE	systemischer Lupus erythematodes
sog.	so genannt
SSc	engl. sideward scatter
Th	T-Helfer
Tfh	T folliculäre Helfer

Abbildungsverzeichnis

1.1	Klinische Präsentation des Pemphigus vulgaris	2
1.2	Klinische Präsentation des Pemphigus foliaceus	2
1.3	Histopathologische Diagnose des Pemphigus vulgaris	3
1.4	Immunpathogenese des Pemphigus vulgaris	5
1.5	Interaktion von Tfh-Zellen mit follikulären B-Zellen innerhalb der Keimzentren . .	8
3.1	Prinzip der PBMC-Separation mittels Dichtegradientenzentrifugation	19
3.2	Prinzip der Durchflusszytometrie	22
3.3	<i>gating</i> -Strategie zur Bestimmung der Zytokinproduktion von CD4 ⁺ T-Zellen . . .	24
3.4	<i>gating</i> -Strategie zur Charakterisierung von Dsg3-spezifischen B-Zellen	25
3.5	Prinzip des ELISpots zur Detektion von IL-21-produzierenden T-Zellen	26
4.1	Desmoglein1- und Desmoglein3-Autoantikörper und Therapie der untersuchten Pemphigus vulgaris - Patienten	30
4.2	Zytokinkonzentrationen von Interleukin 4, 17 und 21 im Plasma von Patienten und Kontrollen	32
4.3	Untersuchung der Abhängigkeit der Interleukin-21 Plasmakonzentrationen vom Krankheitszustand und Autoantikörpern	33
4.4	Verlauf von Interleukin-21 und Desmoglein3-spezifischen Autoantikörpern im Plasma von Pemphigus vulgaris Patienten unter immunsuppressiver Therapie .	34
4.5	Produktion von Interleukin-21 bei CD4 ⁺ T-Helfer-Zellen	35
4.6	Zytokinproduktion in CD4 ⁺ T-Zellen in Patienten mit Pemphigus vulgaris und Kontrollen	35
4.7	Zytokinsignatur von Interleukin-21-produzierenden T-Zellen	36
4.8	Interleukin-21-Produktion von Desmoglein3-spezifischen T-Zellen	37
4.9	Anteil von follikulären T-Helfer-Zellen im peripheren Blut von Pemphigus vulgaris -Patienten und Kontrollen	38
4.10	Strategie zur Detektion von Desmoglein3-spezifischen B-Zellen mittels fluoreszenzmarkierten Autoantigen	39
4.11	Spezifität von Hybridomzelllinien gegenüber Desmoglein3 und Desmoglein3 - Subdomänen	40
4.12	Bestimmung der Spezifität von B-Zell-Klonen für Desmoglein3 und Desmoglein3-Subdomänen nach Subklonierung	41
4.13	Detektion von Desmoglein3-spezifischen B-Zell-Klonen mit fluoreszenzmarkierten Autoantigen	42
4.14	Titration von Desmoglein3-spezifischen B-Zell-Klonen	43
4.15	Definition von B-Zell-Subpopulationen anhand der Oberflächenexpression von CD27 und CD38	44
4.16	B-Zell-Verteilung bei Pemphigus vulgaris - Patienten und Kontrollen	45
4.17	Verteilung von Desmoglein3-spezifischen B-Zellen bei Pemphigus vulgaris -Patienten und Kontrollen	45
4.18	Untersuchung der Korrelation der Desmoglein3-spezifischen B-Zellen mit Autoantikörpern	46

4.19	Einfluss von systemischen Therapien auf Desmoglein3-spezifische B-Zellen . .	47
4.20	Dsg3-spezifische Gedächtnis B-Zellen bei PV-Patienten unter Rituximabtherapie	47
5.1	Möglicher Einfluss von Interleukin-21-produzierenden T-Zellen bei der Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen beim Pemphigus vulgaris	48

Tabellenverzeichnis

1	Klinik, Autoantikörper und Therapie der untersuchten Pemphigus vulgaris - Patienten mit Rezidiv	84
2	Klinik, Autoantikörper und Therapie der untersuchten Pemphigus vulgaris - Patienten mit remittierenden Krankheitsstatus	85

1. Einleitung

1.1 Die Autoimmunerkrankung Pemphigus

Der Pemphigus (griech. *pemphix*; Blase) umfasst eine Gruppe von seltenen lebensbedrohlichen organspezifischen Autoimmunerkrankungen, die durch die Bildung von Blasen und Erosionen innerhalb der Epidermis an der Haut und den Schleimhäuten gekennzeichnet sind (Pollmann et al., 2018; Kasperkiewicz et al., 2017; Bystryn und Rudolph, 2005). Die Erkrankung wird hervorgerufen durch Autoantikörper, die sich gegen die desmosomalen Cadherine der in der Haut befindlichen Keratinozyten, vor allem Desmoglein (Dsg)1 und Dsg3, richten und in der Folge zu einem Adhäsionsverlust der epidermalen Keratinozyten (sog. Akantholyse) führen (Amagai et al., 1991). Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3 vom Typ IgG korrelieren in der Regel mit dem Krankheitsverlauf und dem Ausmaß der betroffenen Haut- und Schleimhautareale (Harman et al., 2001). Die zwei klinisch am häufigsten beobachteten Formen des Pemphigus sind der Pemphigus vulgaris (lat. *vulgaris*; gewöhnlich), der meist einen ausgeprägten Verlust des Epithels der Schleimhäute bzw. Epidermis der Haut (sog. Erosion) zeigt, und der Pemphigus foliaceus (lat. *folie*; blättrig), der durch eine mehr fragile, oberflächliche Blasenbildung mit Erosionen, die eine blattartige Schuppung aufweisen, gekennzeichnet ist (Kneisel und Hertl, 2011a).

Aufgrund der in weiten Teilen gut charakterisierten Immunpathogenese des Pemphigus und der im Vergleich zu anderen Autoimmunerkrankungen detaillierten Identifikation der an der Krankheitspathogenese beteiligten Autoantigene in der Haut, wird der Pemphigus als Modellerkrankung einer organspezifischen Autoimmunerkrankung angesehen. In dieser können die grundlegenden immunologischen Mechanismen, die zur Entstehung von Autoimmunität beitragen, auf immunzellulärer und humoraler Ebene nachvollzogen werden (Amagai, 2002; Hertl und Veldman, 2001). Untersuchungen innerhalb dieser Modellerkrankung erlauben ein tieferes Verständnis der Immunpathogenese und können als Grundlage für die Entwicklung von verbesserten zielgerichteten Therapieformen für den Pemphigus sowie für andere Autoantikörpervermittelte Autoimmunerkrankung mit ähnlicher Immunpathogenese dienen.

1.2 Pemphigus vulgaris als häufigste Form des Pemphigus

Der Pemphigus vulgaris (PV) ist die klinisch am häufigsten beobachtete Form des Pemphigus mit einer Inzidenz von 1-5/10⁶ Personen in Mitteleuropa (Kneisel und Hertl, 2011a). Männer und Frauen sind im gleichen Umfang von der Erkrankung betroffen. Der PV ist eine Erkrankung, die sich in der zweiten Lebenshälfte (meist im Alter von 40-60 Jahren) manifestiert, wobei in seltenen Fällen auch jüngere Patienten betroffen sein können. Klinisch ist der PV durch Blasenbildung an der Haut- und Schleimhäuten charakterisiert, welche allerdings aufgrund ihrer Fragilität klinisch nur selten beobachtet werden können und früh in großflächige, schmerzhaft Erosionen übergehen (Abb.1.1). Oft zeigen sich diese zunächst an den Schleimhäuten (vor allem oral und genital) und können im weiteren Verlauf bei einem Teil der Patienten auf andere Hautareale am Körperstamm übergreifen (Kneisel und Hertl, 2011a,b). Abzugrenzen ist der PV von dem noch seltener anzutreffenden Subtyp des Pemphigus foliaceus (PF), der durch eine

im Vergleich zum PV epidermal deutlich oberflächlichere Blasenbildung entlang der Talgdrüsen (seborrhoisches Areale, wie Kopf, Brust, Rücken und Schultern) gekennzeichnet ist (Abb.1.2) und keine Erosionen an den Schleimhäuten aufweist (James et al., 2011).

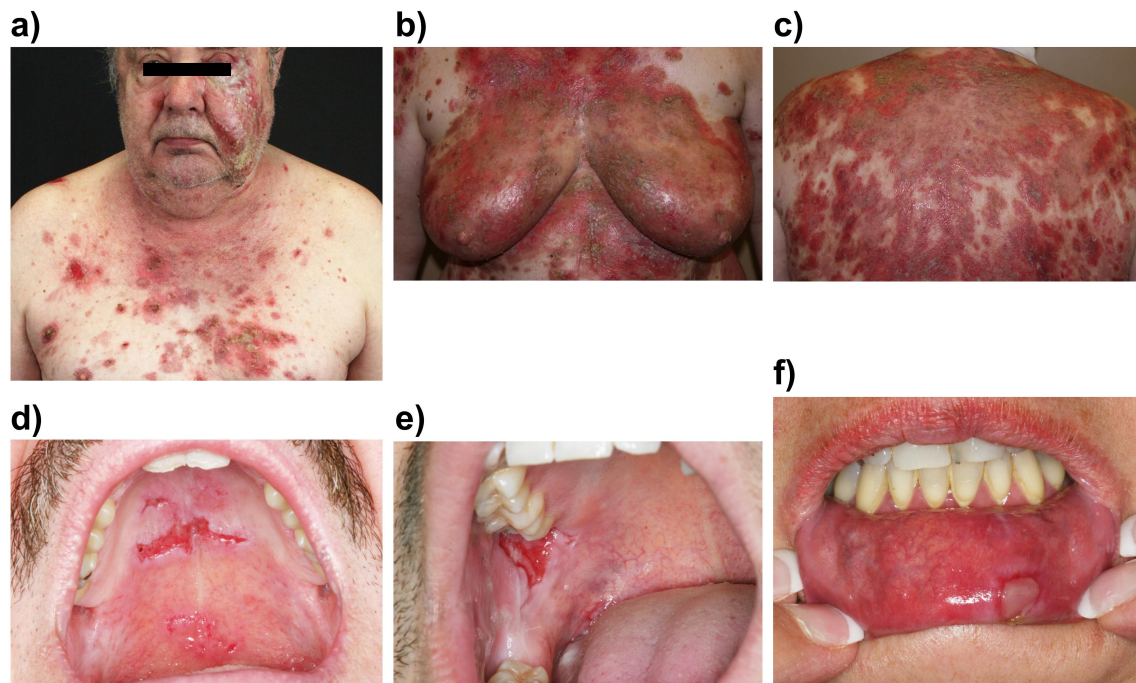


Abb. 1.1: Klinische Präsentation des Pemphigus vulgaris. Großflächige, teilweise konfluente Erosionen an der Haut im Bereich des (a) Gesichts und oberen Thorax, (b) Oberkörper und (c) Schultern. Scharf abgegrenzte Schleimhauterosionen am (d) Gaumen und (e) Oberkiefer sowie kleinere oberflächliche Blasen an der (f) Unterlippe. Modifiziert nach Pollmann et al., 2018.

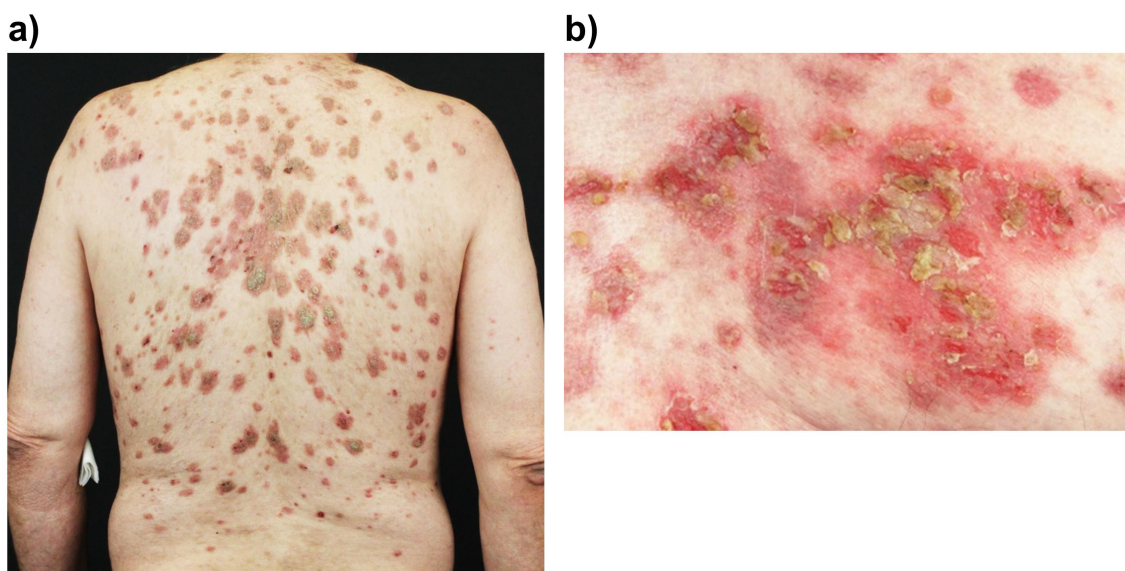


Abb. 1.2: Klinische Präsentation des Pemphigus foliaceus. (a) Schuppige Hauterosionen und Plaques an den seborrhoischen Arealen des Oberkörpers. (b) Der schuppige Charakter der oberflächlichen Erosionen wird bei höherer Vergrößerung deutlich. Modifiziert nach Pollmann et al., 2018.

1.2.1 Autoantikörper als entscheidendes Kriterium zur Diagnose des PV

Neben dem beschriebenen klinischen Erscheinungsbild basiert die Diagnose des PV im Wesentlichen zum einen auf dem histopathologischen Nachweis des epidermalen Adhäsionsverlust (Abb.1.3a) sowie dem Nachweis von an epidermalen Keratinozyten gebundenen Autoantikörpern mittels direkter oder indirekter Immunfluoreszenz (Abb.1.3b-d). Daneben werden in der Routinediagnostik Autoantikörper gegen die Autoantigene Dsg1 und Dsg3 mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA) oder auch Immunoblot nachgewiesen und als weitere prognostische Verlaufsparemeter erhoben (Pollmann et al., 2018; Kneisel und Hertl, 2011a). Bei aktiver Erkrankung können vor allem Autoantikörper vom Typ IgG4 und auch IgE gefunden werden, wohingegen IgG1-Autoantikörper vermehrt bei Patienten in klinischer Remission beobachtet werden können (Spaeth et al., 2001; Futei et al., 2001; Jones et al., 1988).

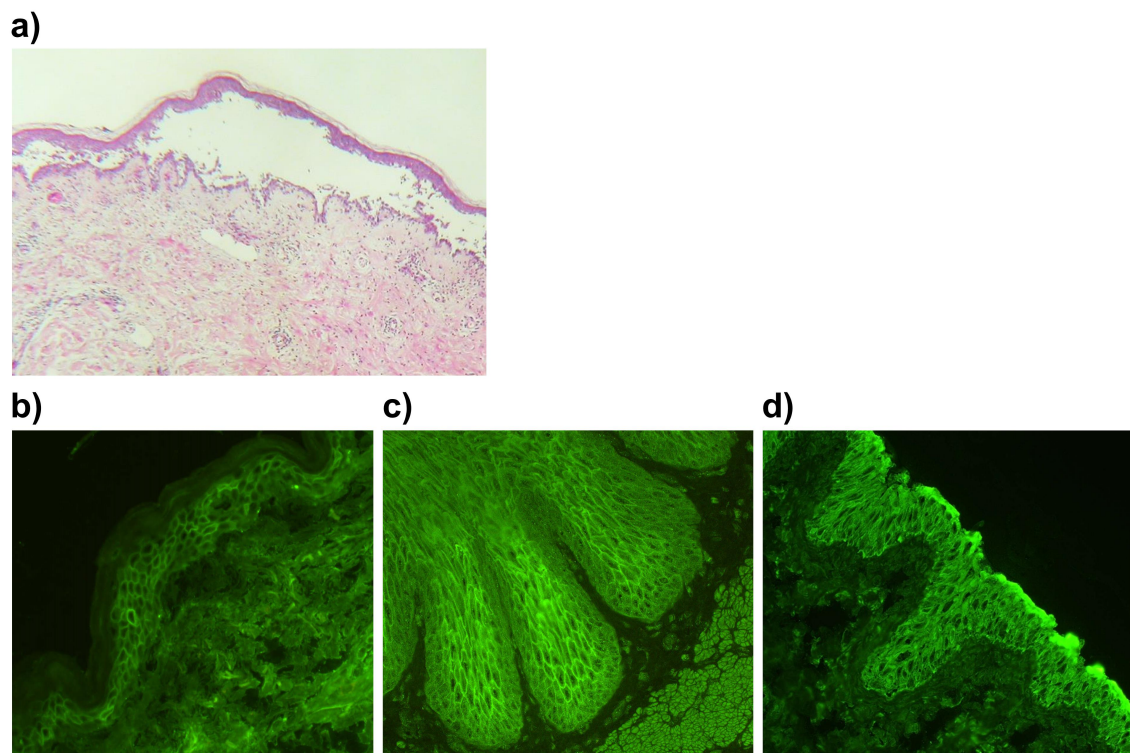


Abb. 1.3: Histopathologische Diagnose des Pemphigus vulgaris. (a) Histologisch ist ein suprabasaler Verlust der Keratinozytenadhäsion innerhalb der lesionalen Hautareale sichtbar. (b) Zudem zeigen sich in der direkten Immunfluoreszenz gebundene IgG-Antikörper an der Oberfläche der epidermalen Keratinozyten mit einem charakteristischen netzartigen Färbungsmuster. In der indirekten Immunfluoreszenz wird dieses Färbemuster bei Inkubation von (c) Affenösoophagus oder auch (d) Rattenblase als Substrat mit Patientenserum ebenfalls sichtbar. Modifiziert nach Pollmann et al., 2018.

1.2.2 Derzeitige Therapieoptionen zur Behandlung des PV

Für den Pemphigus liegen derzeit noch keine kausalen Therapieformen vor, so dass die Erkrankung lediglich immunsuppressiv, mit dem Ziel das Auftreten von neuen Blasen und Erosionen zu verhindern, behandelt werden kann (Pollmann et al., 2018; Eming, 2015). Pemphiguspatienten mit akuten Krankheitsverlauf werden in erster Linie systemisch mit hoch dosierten Glukokorti-

koiden, wie Prednisolon, behandelt, die entsprechend des klinischen Verlauf wieder reduziert werden. Daneben kommen steroideinsparende adjuvante Immunsuppressiva, meist Azathioprin und Mycophenolat-Mofetil, zum Einsatz (Murrell et al., 2020). Die Therapie mit Glukokortikoiden ist bei längerer Anwendungsdauer mit teils erheblichen Nebenwirkungen (u.a. Osteoporose und Cushing-Syndrom) verbunden. Daneben rückt die zielgerichtete Depletion von B-Zellen mittels des therapeutischen anti-CD20 Antikörpers Rituximab zunehmend in den Fokus, da hierdurch in vielen Fällen eine schnelle und meist länger anhaltende Remission bei den Patienten erzielt werden kann (Joly et al., 2017; Colliou et al., 2013; Eming et al., 2008). In refraktären Fällen, bei denen die Krankheitsaktivität durch diese *first-line* Therapie nicht unterdrückt werden kann, bestehen weitere *second-line* Therapieoptionen in der therapeutischen Entfernung von zirkulierenden Autoantikörpern mittels Immunapharese und der intravenösen Gabe von hoch dosierten Immunglobulinen (engl. *intravenous immunoglobulins*; IVIg) (Murrell et al., 2020). Dennoch kann das Therapieziel beim Pemphigus, die vollständige klinische Remission mit Abheilung aller Blasen und Erosionen, bei einer Vielzahl von Patienten nur in unbefriedigendem Maß erreicht werden, da es bei Reduktion bzw. Beendigung der oben genannten Therapieformen oft zu erneuten Exazerbationen der Krankheitsaktivität kommt.

Die Entwicklung von neuen Therapieansätzen, die im Vergleich zu den bisherigen Therapieformen eine spezifischere und länger anhaltende Immunsuppression zusammen mit einem geringeren Nebenwirkungsspektrum aufweisen, ist daher weiterhin notwendig um die Behandlung des Pemphigus zusätzlich zu verbessern (Didona et al., 2019).

1.3 Die Immunpathogenese des PV

Im Vergleich zu anderen Autoimmunerkrankungen ist die Pathogenese des PV, auch aufgrund der eng begrenzten Anzahl an pathogenetisch relevanten Autoantigenen, relativ gut verstanden. Der Verlust der Immuntoleranz gegenüber Dsg3 und Dsg1 stellt hierbei den zentralen Punkt in der Immunpathogenese des PV dar. Dies führt in der Folge zur Ausbildung von pathogenen Autoantikörpern, die zum klinischen Bild des PV führen. An diesem Prozess sind autoreaktive B-Zellen und T-Zellen entscheidend beteiligt, die durch ihr enges Zusammenspiel untereinander die pathogene Immunantwort initiieren und vorantreiben (Abb.1.4).

1.3.1 Die Rolle von Autoantikörpern gegen Dsg1 und Dsg3

Die desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 werden als Hauptautoantigene beim PV angesehen (Amagai et al., 1991; Koulu et al., 1984). Autoantikörper gegen eines oder beide Autoantigene können serologisch bei der Mehrheit der PV-Patienten nachgewiesen werden (Lenz et al., 1999). Daneben können in einigen Fällen Autoantikörper gegen weitere desmosomale Adhäsionsproteine, wie Desmocolline und Desmoplakine gefunden werden (Nguyen et al., 2000; Rafei et al., 2011), wobei die pathogenetische Relevanz dieser Autoantigene noch nicht hinreichend beschrieben ist und man derzeit davon ausgeht, dass diese nicht gegen Dsg1- oder Dsg3 gerichteten Autoantikörper die Entwicklung des klinischen Bildes des Pemphigus zusätzlich begünstigen (Sinha und Sajda, 2018; Ahmed et al., 2016). Zusätzlich korrelieren

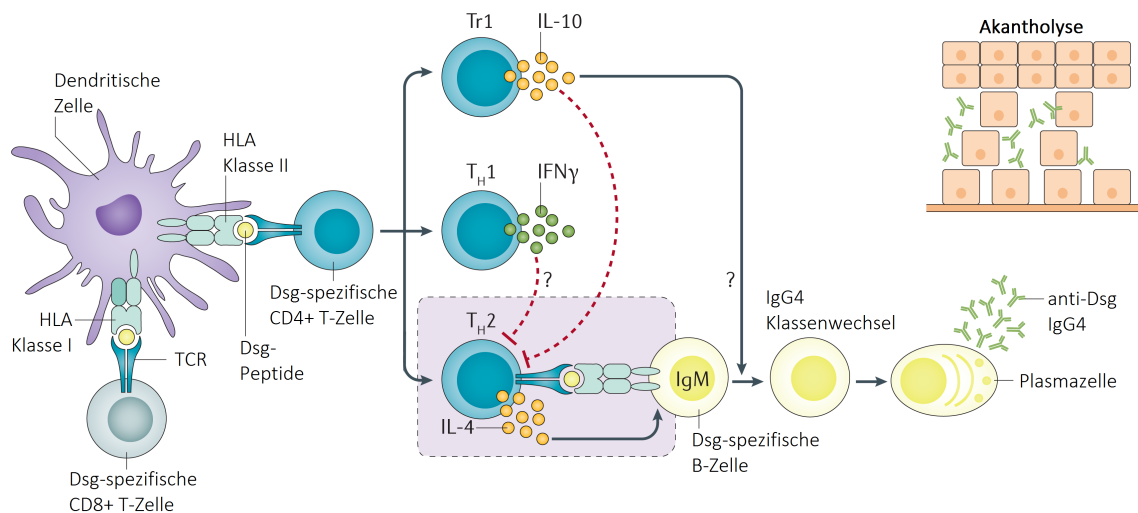


Abb. 1.4: Immunpathogenese des Pemphigus vulgaris. Vereinfachte Übersicht mit den wesentlich an der Immunpathogenese des Pemphigus vulgaris (PV) beteiligten Immunzellen. Dendritische Zellen präsentieren Dsg-Peptide über Humanes Leukozyten Antigen (HLA)-Klasse II Allele. In der Folge kommt es zur Aktivierung von Dsg-spezifischen T-Zellen und einer vorrangig Th2-vermittelten Autoimmunantwort. Diese führt zur Stimulation von Dsg-spezifischen B-Zellen, die nach IgG-Klassenwechsel und Affinitätsreifung pathogene anti-Dsg IgG4 Autoantikörper produzieren. Nach Bindung der Autoantikörper an die Zielstrukturen in der Haut kommt es zum für den PV typischen Adhäsionsverlust der epidermalen Keratinozyten (Akantholyse). Modifiziert nach Kasperkiewicz et al., 2017.

die Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3 im Serum in den meisten Fällen mit der Krankheitsaktivität der Pemphiguspatienten, wobei hier Dsg1-Autoantikörper besser mit den Blasen und Erosionen an der Haut korrelieren als dies für Dsg3-Autoantikörper und Schleimhauterosionen der Fall ist (Harman et al., 2001).

Abhängig vom jeweiligen Autoantikörperprofil unterscheidet man beim PV das klinische Bild der mukosalen, nur die Schleimhaut betreffenden Form und der mukokutanen Form, bei der die Schleimhäute und die Haut betroffen sind. Bei der mukosalen Form können serologisch in der Regel ausschließlich Autoantikörper gegen Dsg3 gefunden werden, wohingegen bei der mukokutanen Form Autoantikörper gegen Dsg3 und Dsg1 vorhanden sind. Die unterschiedliche klinische Ausprägung wird nach dem derzeitigen Verständnis mit der sog. Kompensationshypothese begründet, die auf der unterschiedlichen Expression von Dsg1 und Dsg3 innerhalb der Haut und Schleimhäute basiert (Mahoney et al., 1999). Da in den Schleimhäuten vorrangig Dsg3 exprimiert wird, führt bereits das alleinige Vorhandensein von Dsg3-Autoantikörper bei der mukosalen Form zu Erosionen an den Schleimhäuten. An der Haut tritt hingegen keine Blasenbildung auf, da hier zusätzlich Dsg1 exprimiert wird, welches den funktionellen Verlust von Dsg3 kompensieren kann. Treten jedoch Autoantikörper gegen Dsg3 und Dsg1 gleichermaßen auf, ist diese Kompensation nicht mehr gegeben, sodass bei der mukokutanen Form ebenfalls eine Blasenbildung an der Haut beobachtet werden kann.

Die pathogenetische Relevanz von Autoantikörpern gegen Dsg1 und Dsg3 konnte in einer Vielzahl von *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden (Amagai et al., 1994; Koch et al., 1997). So ist es möglich alleinig durch den Transfer von IgG-Autoantikörpern eines Pem-

phiguspatienten die Erkrankung in einem Empfängerorganismus zu induzieren. Klinisch zeigt sich dieser Effekt beim Pemphigus neonatorum, bei dem über die Plazenta übertragene maternale Autoantikörper einer an Pemphigus erkrankten schwangeren Patientin zu zeitlich begrenzten bullös-erosiven Hautläsionen beim Neugeborenen führen (Sárdy und Kasperkiewicz, 2013). Im experimentellen Tiermodell kann eine Blasenbildung und ein histologisch sichtbarer Adhäsionsverlust durch den passiven Transfer von IgG-Autoantikörpern in neonatale Mäuse induziert werden (Anhalt et al., 1982). Zusätzlich führen *in vitro* Dsg-spezifische IgG-Autoantikörper zum Verlust der desmosomalen Integrität und anschließender Dissoziation von Keratinozyten (Heupel et al., 2008; Calkins et al., 2006).

1.3.2 Autoreaktive B-Zellen beim PV

Autoreaktive B-Zellen nehmen als Produzenten von Dsg-spezifischen Autoantikörpern eine zentrale Stellung in der Immunpathogenese des Pemphigus ein. Durch verschiedene Studien des B-Zell-Repertoires beim Patienten sowie durch Untersuchungen im tierexperimentellen Modell des Pemphigus konnten autoreaktive B-Zellen bereits näher charakterisiert werden (Hammers und Stanley, 2016; Payne et al., 2005; Tsunoda et al., 2003). Der Großteil der bisher identifizierten B-Zell-Klone zeigt somatische Mutationen, die einen durch autoreaktive T-Zellen getriebenen Prozess der Affinitätsreifung vermuten lassen (Di Zenzo et al., 2012; Payne et al., 2005). Dennoch konnten in einer Studie von Cho et al. Dsg3-spezifische B-Zell-Klone in PV-Patienten identifiziert werden, deren Antikörper als Gemeinsamkeit die gleichen variablen Domänen in der schweren Antikörperkette (VH1-46) besitzen, allerdings nur geringe Mutationen aufwiesen (Cho et al., 2014). Es wird daher vermutet, dass Autoantikörper, die die VH1-46-Domäne verwenden, die Entstehung von Dsg3-Autoantikörpern in einem frühen Stadium der Erkrankung begünstigen können (Cho et al., 2014).

In jüngster Zeit konnten umfangreiche Erkenntnisse über die Natur von autoreaktiven B-Zellen beim Pemphigus durch die Untersuchung von Patienten, die mit dem therapeutischen anti-CD20-Antikörper Rituximab behandelt wurden, erzielt werden. Dieser führt bei den Patienten zu einer allgemeinen Depletion von peripheren B-Zellen (Ran und Payne, 2017). Durch die inzwischen weit verbreitete Verwendung konnte das klinische Ansprechen von Pemphiguspatienten auf eine Behandlung mit Rituximab in einer Vielzahl von Studien dargestellt werden (Ahmed et al., 2015; Ahmed und Shetty, 2015; Joly et al., 2007). Im Mittel kann bei 60-100 % der Patienten eine vollständige klinische Remission innerhalb von 3-6 Monaten erzielt werden (Kasperkiewicz et al., 2017). Dennoch wird eine langfristige Remission bei einem großen Teil der Patienten nicht erreicht, die mittlere Remissionsdauer liegt bei 15-19 Monaten (Kasperkiewicz et al., 2017). So kommt es im Verlauf der nach der Rituximabbehandlung einsetzenden Repopularisierung von B-Zellen im peripheren Blut häufig zu klinischen Rezidiven, die mit dem Wiederauftreten von Dsg-spezifischen Autoantikörpern im Serum der Patienten einhergehen (Ahmed und Shetty, 2015). Diese Daten deuten darauf hin, dass Dsg3-spezifische B-Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Remission wieder aktiviert werden, was die Basis für ein klinisches Rezidiv bilden kann. Ob diese durch die gleichen, oder durch *de novo* erzeugte autoreaktive B-Zellen hervorgerufen werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Proteomische

Analysen der im Patientenserum vorkommenden Autoantikörper zeigen zum Einen, dass Pemphiguspatienten ein diverses polyklonales Repertoire von Autoantikörpern besitzen (Chen et al., 2017). Dagegen konnte durch die genetische Charakterisierung von aus dem B-Zell-Repertoire von PV-Patienten klonierten anti-Dsg3-IgG gezeigt werden, dass klinische Rezidive mit den gleichen B-Zell-Klonen assoziiert sind, die vor der Behandlung mit Rituximab beobachtet werden konnten, wohingegen bei Patienten, die sich in einer längeren klinischen Remission befanden, keine autoreaktiven Klone gefunden werden konnten (Hammers et al., 2015). Es wird daher vermutet, dass klinische Rezidive durch eine unvollständige Depletion von autoreaktiven B-Zell-Klonen hervorgerufen werden. Eine frühe und wiederholte Therapie mit Rituximab zu Beginn einer Pemphiguserkrankung könnte daher dazu beitragen autoreaktive B-Zellen frühzeitig und dauerhaft zu depletieren und eine länger anhaltende klinische Remission beim Patienten zu erzielen (Joly et al., 2017).

1.3.3 Autoreaktive T-Zellen beim PV

Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien konnten zeigen, dass autoreaktive CD4⁺ T-Zellen an der Entstehung von Dsg3-Autoantikörpern beteiligt sind, indem sie autoreaktive B-Zellen stimulieren und in der Folge zur Produktion von Dsg-Autoantikörpern anregen (Eming et al., 2014; Amber et al., 2013; Yokoyama und Amagai, 2010; Takahashi et al., 2009). Bestimmte Humane Leukozyten Antigen (HLA)-Klasse II Haplotypen, vor allem HLA-DRB1*0402 und HLA-DQB1*0503 in der zentraleuropäischen Bevölkerung, sind mit der Erkrankung assoziiert und können bei einem Großteil der Patienten gefunden werden (Svecova et al., 2015), wobei einzelne Haplotypen weltweit in einzelnen Ländern und Ethnien unterschiedlich häufig vorkommen (Ahmed et al., 1991, 1990; Lee et al., 2006). Es wird angenommen, dass die in den Haplotypen kodierenden *major histocompatibility complex* (MHC)-Moleküle eine erhöhte Bindungsstärke gegenüber einzelnen Peptidsequenzen des Dsg3 aufweisen, welches in der Folge eine gestörte Immuntoleranz und die Entstehung von Dsg3-spezifischen T-Zellen begünstigt (Tong et al., 2006; Wucherpfennig et al., 1995). Die Tatsache, dass bei Patienten mit aktiver Erkrankung vorrangig Antikörper vom Typ IgG4 gefunden werden können (Spaeth et al., 2001; Futei et al., 2001; Jones et al., 1988), spricht zusätzlich für eine Beteiligung von autoreaktiven T-Zellen beim IgG-Klassenwechsel.

Das derzeitige Verständnis über die Immunpathogenese des PV geht davon aus, dass Th2-assoziierte Zytokine essentiell für die Entstehung von Dsg3-Autoantikörpern sind, wohingegen Th1-Zytokine keinen entscheidenden Einfluss auf die Immunpathogenese des PV haben (Di Zenzo et al., 2016; Giordano und Sinha, 2012). So können im Serum von Patienten vor allem die T-Helfer (Th)2-Zytokine Interleukin (IL)-4, IL-6 und IL-10 gefunden werden, wohingegen Th1-Zytokine, wie IL-2 und Interferon-gamma, verringert vorkommen (Giordano und Sinha, 2012; Satyam et al., 2009). Daneben können bei Patienten wie auch Gesunden Dsg3-spezifische T-Zellen mit einer Th1-Signatur gefunden werden, wohingegen IL-4-produzierende autoreaktive T-Zellen predominant bei PV-Patienten vorkommen (Veldman et al., 2003). Zusätzlich zeigen die Untersuchungen in einem Tiermodell des PV, dass die Inhibition von IL-4 zu einer deutlich verringerten Produktion von Dsg3-Autoantikörpern führt (Takahashi et al., 2008).

In Erweiterung des zuvor beschriebenen Th1/Th2-Paradigmas konnte in jüngeren Untersuchungen die potentielle Beteiligung anderer Zytokine, die eine pathogenetische Rolle beim PV einnehmen könnten, aufgezeigt werden (Giordano und Sinha, 2012). Hierzu zählt unter anderem das Zytokin IL-17, welches der T-Zell-Subpopulationen der Th17-Zellen zugeordnet wird. In einzelnen Studien konnten erhöhte IL-17-Serumspiegel bei PV-Patienten beobachtet werden (Timoteo et al., 2017; Asothai et al., 2015), wobei in anderen Untersuchungen gegenteilige Beobachtungen gemacht wurden (Lee et al., 2017). Zusätzlich wurden im peripheren Blut als auch im lesionalen Hautgewebe von PV-Patienten erhöhte Mengen von IL-17-produzierenden Th17-Zellen im Vergleich zu nicht erkrankten Kontrollpersonen gefunden (Arakawa et al., 2009; Xu et al., 2013). Dennoch ist die pathogenetische Relevanz von Th17-Zellen sowie anderer über Th1- und Th2-Zellen hinausgehenden T-Zell-Subpopulationen bei der Immunpathogenese des Pemphigus derzeit noch nicht hinreichend bekannt.

1.4 T-Zell-vermittelte Induktion einer Antikörperantwort

1.4.1 T folliculäre Helferzellen

T folliculäre Helfer (T_{fh})-Zellen sind eine auf die B-Zell-Hilfe spezialisierte T-Zell-Population und besitzen daher eine essentielle Funktion bei der Induktion einer Antikörper-vermittelten Immunantwort. Bisherige Untersuchungen bei verschiedenen Antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankungen legen nahe, dass eine gestörte Funktion von T_{fh}-Zellen die Entstehung einer pathogenen Autoantikörperantwort und damit die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen kann (Ueno, 2016; Crotty, 2014; Tangye et al., 2013). T_{fh}-Zellen sind innerhalb der sekundären lymphoiden Organe lokalisiert und unterscheiden sich hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer Funktion von den klassischen Th1- und Th2-Zellen (Vinuesa et al., 2016; Crotty, 2014) (Abb.1.5).

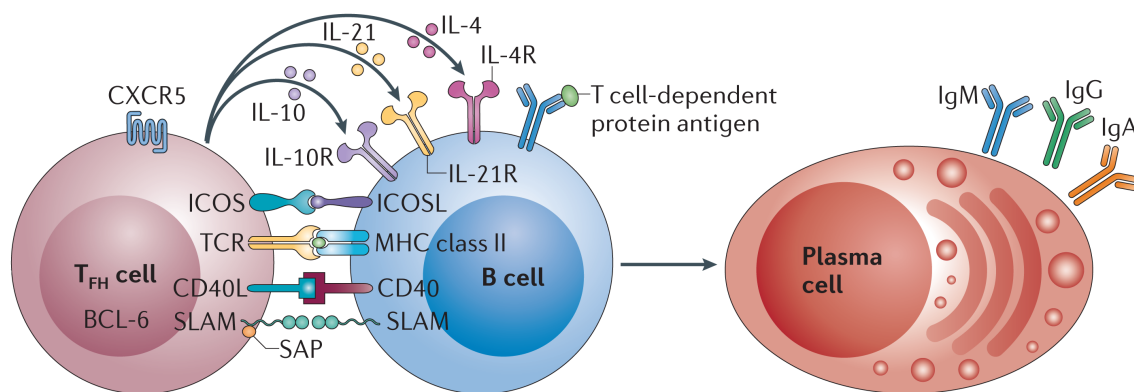


Abb. 1.5: Interaktion von T_{fh}-Zellen mit folliculären B-Zellen innerhalb der Keimzentren. Schematische Übersicht über die Interaktion von T_{fh}-Zellen und B-Zellen mit den für die Funktion von T_{fh}-Zellen maßgeblichen Rezeptoren und sezernierten Zytokinen. T_{fh}-Zellen exprimieren als charakteristischen Marker den Transkriptionsfaktor Bcl6 sowie den Chemokinrezeptor CXCR5 auf der Zelloberfläche. Über die T-Zell-Rezeptor vermittelte Interaktion von T_{fh}-Zellen und folliculären B-Zellen und der Kostimulation über die Rezeptoren ICOS, CD40L (und PD-1, nicht dargestellt) induzieren T_{fh}-Zellen die Entwicklung von B-Zellen hinzu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Das Zytokin IL-21 ist vor diesen Prozess von entscheidender Bedeutung, wobei T_{fh}-Zellen auch IL-4 und IL-10 sezernieren können. Modifiziert nach Tangye et al., 2013.

Sie exprimieren den spezifischen Transkriptionsfaktor Bcl6, der maßgeblich für die Entwicklung und Funktion der Tfh-Zellen ist und die Expression essentieller Oberflächenmoleküle sowie die Sekretion von spezifischen Zytokinen steuert (Di Yu et al., 2009; Nurieva et al., 2009). Als charakteristischen Oberflächenmarker zeichnen sich Tfh-Zellen durch die starke Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 aus (Kim et al., 2001; Breitfeld et al., 2000). Dieser ist essentiell für die CXCL-13-abhängige Einwanderung und anschließende Interaktion von Tfh-Zellen mit follikulären B-Zellen innerhalb der B-Zell-Follikel der Keimzentren (Ansel et al., 1999). Daneben tragen sie eine Reihe von kostimulatorischen Molekülen, wie *programmed cell death protein 1* (PD-1) und *inducible T cell costimulator* (ICOS) (Weber et al., 2015; Dorfman et al., 2006), welche im Zusammenspiel mit der T-Zell-Rezeptor-vermittelten Interaktion der Tfh-Zelle mit B-Zellen über MHC-Klasse II durch positive und negative Signale die anschließende B-Zell-Stimulation und Antikörperproduktion entscheidend modulieren.

Obwohl klassische Tfh-Zellen nur innerhalb der Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe vorkommen, können CD4⁺CXCR5⁺ T-Zellen auch im peripheren Blut gefunden werden, wobei diese Zellen sich durch eine verringerte Expression von PD-1 und ICOS und eine nur vereinzelt zu beobachtende Expression von Bcl6 auszeichnen (Morita et al., 2011). Dennoch zeigen jene Zellen eine starke Verwandtschaft zu Tfh-Zellen und sind insbesondere in der Lage nach Antigenexposition eine Antikörperantwort zu induzieren. Sie werden daher als 'zirkulierende' Tfh-Zellen bezeichnet und als peripheres Gegenstück zu den klassischen Tfh-Zellen angesehen (He et al., 2013; Schmitt et al., 2014). Zusätzlich können zirkulierende Tfh-Zellen anhand der Oberflächenmarker CXCR3 und CCR6 anlehnend an die klassische Einteilung von Th1- und Th2-Zellen in die funktionell unterschiedlichen Populationen Tfh1, Tfh2 sowie Tfh17 eingeteilt werden. Insbesondere Tfh2 und auch Tfh17 sind hierbei nach *in vitro* Kokultur mit B-Zellen in der Lage eine Antikörperproduktion und IgG-Klassenwechsel zu induzieren, während dies für Tfh1 nicht der Fall ist (Morita et al., 2011).

Ein wichtiges funktionelles Zytokin, das von Tfh-zellen produziert wird, ist IL-21 (Spolski und Leonard, 2010). Daneben können weitere T-Zell-Subpopulationen, wie Th17-Zellen, IL-21 sezernieren, wobei Tfh-Zellen als Hauptproduzenten von IL-21 angesehen werden (Lüthje et al., 2012; Ma et al., 2012). Die IL-21-abhängige Stimulation im Kontext der Interaktion der Tfh-Zelle mit naiven oder Gedächtnis B-Zellen ist hierbei essentiell für die anschließende Differenzierung in Antikörper-sezernierende Plasmablasten bzw. Plasmazellen (Kuchen et al., 2007; Ettinger et al., 2005; Ozaki et al., 2004) (Abb.1.5).

1.4.2 IL-21 und Tfh-Zellen im Kontext von Autoantikörper-vermittelter Autoimmunität

Phänotypische und funktionelle Veränderungen von zirkulierenden Tfh-Zellen und dem assoziierten Zytokin IL-21 konnten bei verschiedenen Autoantikörper-vermittelten Autoimmunerkrankungen beobachtet werden und legen eine Beteiligung dieser Zellen in der Immunpathogenese nahe (Gensous et al., 2018).

Beim systemischen Lupus erythematoses (SLE) konnte in mehreren Untersuchungen ein erhöhtes Vorkommen von Tfh-Zellen im peripheren Blut von Patienten gezeigt werden (Kim et al., 2018). Im Blut von Patienten mit aktiven SLE zeigen sich vermehrt Tfh-Zellen, definiert als CD4⁺CXCR5⁺ bzw. CD4⁺CXCR5⁺ICOS^{hi} oder CD4⁺CXCR5⁺PD-1^{hi} Zellen, die mit der Schwere der Erkrankung sowie den Autoantikörpern bzw. Antikörper-produzierenden Plasmablasten im peripheren Blut korrelieren (Xu et al., 2017; Zhang et al., 2015; Choi et al., 2015; Simpson et al., 2010). Daneben können gesteigerte Spiegel von IL-21 im Serum der Patienten einhergehend mit der Präsenz von IL-21-produzierenden Tfh2-Zellen im peripheren Blut beobachtet werden, wobei die Anzahl von Tfh-Zellen nicht mit den IL-21 Serumspiegeln korreliert (Wang et al., 2014; Le Coz et al., 2013; Simpson et al., 2010). In einer Studie von Zhang et al. konnte zudem gezeigt werden, dass aus dem Blut isolierte CD4⁺CXCR5⁺ Tfh-Zellen gesteigerte Mengen an IL-21 sowie IL-6 und IL-10 produzieren und *in vitro* nach Kokultur mit isolierten B-Zellen in der Lage sind, die Produktion von für den SLE charakteristischen antinukleären Antikörpern zu induzieren (Zhang et al., 2015). Andere Antikörper-vermittelte Autoimmunerkrankungen, wie die rheumatoide Arthritis, bei der es zur chronischen Entzündung der Gelenke kommt, sowie die das Nervensystem betreffende Myasthenia gravis, zeigen ebenfalls ein erhöhte Zahl von Tfh-Zellen und gesteigerte IL-21 Serumspiegel (Wang et al., 2013; Luo et al., 2013; Liu et al., 2012).

Bei Patienten mit bullösen Pemphigoid (BP), einer klinisch zum PV ähnlichen blasenbildenden Autoimmunerkrankung der Haut, bei der sich die Autoantikörper nicht gegen Dsg1 und Dsg3 sondern gegen die Hauptantigene BP180 (Kollagen XVII) und BP230 richten, konnte in einer Studie von Li et al. ebenfalls ein erhöhtes Vorkommen von CD4⁺CXCR5⁺ Tfh-Zellen sowie gesteigerte IL-21 Serumspiegel beobachtet werden (Li et al., 2013). Hierbei wurde insbesondere eine starke Korrelation von Serum-IL-21 mit zirkulierenden BP180-Autoantikörpern festgestellt. Obwohl eine gesteigerte CXCR5-Expression bei zirkulierenden Tfh-Zellen bei den oben genannten Autoimmunerkrankungen beobachtet werden kann, konnten in einer aktuellen Untersuchung von Rao et al. pathogene ICOS^{hi} Tfh-Zellen im Gelenkgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis identifiziert werden, die keine Expression von CXCR5 aufweisen (Rao et al., 2017). Somit kann sich der Phänotyp von Tfh-Zellen abhängig vom untersuchten Gewebe unterscheiden.

1.5 Zielsetzung

Derzeit sind die genauen zellulären und humoralen Mechanismen der an der Autoantikörperantwort des Pemphigus beteiligten Immunzellen in vielen Einzelheiten noch nicht vollkommen verstanden. Ziel dieser Arbeit ist daher eine eingehendere Untersuchung der adaptiven Immunantwort beim PV. Hierfür sollen zum einen T-Zellen und T-zell-assoziierte Zytokine und zum anderen autoreaktive B-Zellen, die sich gegen Dsg3 als Hauptautoantigen des PV richten, im peripheren Blut von Patienten analysiert werden.

Um näher Aufschluss über eine Beteiligung von IL-21 und Tfh-Zellen, welche eine entscheidende Stellung bei der Induktion einer Antikörper-vermittelten Immunantwort einnehmen, in der Immunpathogenese des Pemphigus zu erhalten, sollen diese in einem Kollektiv aus Patienten mit PV mit unterschiedlichen Krankheitszustand im Vergleich zu gesunden Kontrollen eingehend untersucht werden. Hierbei soll neben der Bestimmung des Markerzytokins IL-21 im Blut der Patienten die Sekretion von IL-21 durch CD4⁺ T-Zellen und der Bezug zum individuellen Krankheitszustand und Autoantikörpertitern näher betrachtet werden. Zusätzlich soll die IL-21-Sekretion von Dsg3-spezifischen T-Zellen analysiert werden, mit dem Ziel die funktionelle Rolle von IL-21 bei autoreaktiven T-Zellen weiter bestimmen zu können. Des Weiteren soll die Frequenz und der Phänotyp von zirkulierenden Tfh-Zellen hinsichtlich möglicher pathogener Veränderungen untersucht werden.

Zudem soll die im peripheren Blut von Patienten mit Pemphigus vorherrschende Verteilung von autoreaktiven B-Zellen, welche die Grundlage für mögliche Rezidive darstellen können, betrachtet werden. Hierzu soll in einem weiteren Teil dieser Arbeit ein sensitives durchflusszytometrisches Testsystem zur Detektion von niedrig-frequenten autoreaktiven B-Zellen, die sich gegen Dsg3 richten, etabliert werden. Für diesen Zweck sollen B-Zell-Klone aus murinen B-Zell-Hybridomzelllinien als geeignete Positiv- und Negativkontrollen generiert werden. Diese sollen anschließend der Evaluierung des Testsystems hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität des Testsystems dienen.

Mit dem etablierten Testsystem erfolgt im Anschluss die Untersuchung der Verteilung von Dsg3-spezifischen B-Zellen innerhalb verschiedener B-Zell-Subpopulationen bei einem Kollektiv aus Patienten mit PV und gesunden Kontrollen. In einem weiteren Schritt soll zudem geklärt werden, inwiefern das Vorkommen von autoreaktiven B-Zellen bei Patienten mit dem Vorhandensein von Autoantikörper im Blut korreliert. Des Weiteren soll analysiert werden, ob sich einzelne autoreaktive B-Zell-Subpopulationen einem Krankheitszustand zuordnen lassen und inwiefern die Therapie der Patienten einen Einfluss hierauf hat.

2. Material

2.1 Immortalisierte Zelllinien

B-Zell-Hybridom-Zellen

Linie	Subklon	Isotyp	Spezifität	Ursprung
304/2 11E7	1H9	Maus IgG	humanes Dsg3	Klinik für Dermatologie und Allergologie, Marburg
304/2 11E7 Sub 1H9	2C10	Maus IgG	humanes Dsg3	Klinik für Dermatologie und Allergologie, Marburg
304/2 4B3	-	Maus IgG	humanes Dsg3	Klinik für Dermatologie und Allergologie, Marburg
304/2 4B3	1F12	Maus IgG	nicht bekannt	Klinik für Dermatologie und Allergologie, Marburg

2.2 Rekombinante Proteine

Folgende rekombinante Proteine aus dem Baculovirus Expressionssystem wurden verwendet.

Name	Beschreibung
Dsg3	extrazelluläre Domänen (EC1 - EC5) von Desmoglein3 (Müller et al., 2006)
Dsg3-AF647	Alexa Fluor 647 – konjugiertes Dsg3
Kollagen7	aminoterminal NC1 (<i>engl. non-collagenous</i>) -Domäne von Kollagen7 (Müller et al., 2010)
Kollagen7-AF647	Alexa Fluor 647 – konjugiertes Kollagen7

2.3 Antikörper

Durchflusszytometrie

Name	Klon	Isoytp	Konjugat	Firma
<u>anti-Human</u>				
anti-CD4	RPA-T4	Maus IgG1, _κ	FITC ^a	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
anti-CD27	M-T271	Maus IgG1, _κ	PE ^b	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
anti-CD38	HIT2	Maus IgG1, _κ	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
anti-CD19	HIB19	Maus IgG1, _κ	PerCP-Cy5.5 ^c	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
anti-CXCR5	RF8B2	Ratte IgG2b, _κ	PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
anti-ICOS	DX29	Maus IgG1, _κ	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
anti-IL-4	MP4-25D2	Ratte IgG1	APC ^d	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
anti-IL-10	JES3-19F1	Ratte IgG2a	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
anti-IL-17A	N49-653	Maus IgG1, _κ	Alexa Fluor 647	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
anti-IL-21	3A3-N2.1	Maus IgG1	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
anti-PD-1	MIH4	Maus IgG1, _κ	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
iso ^e -FITC	MOPC-21	Maus IgG1, _κ	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
iso-PE	MOPC-21	Maus IgG1, _κ	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
iso-APC	MOPC-21	Maus IgG1, _κ	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
iso-PerCP	MOPC-21	Maus IgG1, _κ	PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
iso-PerCP	A95-1	Ratte IgG2b, _κ	PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<u>anti-Maus</u>				
anti-IgG	polyklonal	Ziege IgG	Alexa Fluor 647	ThermoFisher Scientific, Darmstadt

^a Fluorescein isothiocyanate

^b Phycoerythrin

^c Peridinin Chlorophyll Protein Complex - Cyanine Dye 5.5

^d Allophycocyanin

^e Isotypkontrollen

ELISA

Name	Klon	Isotyp	Konjugat	Firma
anti-Dsg3	5G11	Maus IgG1	-	AbD Serotec, Düsseldorf
anti-Etag	polyklonal	Kaninchen IgG	-	Abcam plc, Cambridge, Großbritannien
anti-Human-IgG	polyklonal	Kaninchen IgG	HRP	DAKO GmbH, Hamburg
anti-Human-IL-4	n.a.	n.a.	-	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
anti-Human-IL-4	n.a.	n.a.	Biotin	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
anti-Human-IL-17A	n.a.	n.a.	-	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
anti-Human-IL-17A	n.a.	n.a.	Biotin	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
anti-Human-IL-21	n.a.	n.a.	-	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
anti-Human-IL-21	n.a.	n.a.	Biotin	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
anti-Kaninchen-IgG	polyklonal	Ziege IgG	HRP	DAKO GmbH, Hamburg
anti-Maus-IgG	polyklonal	Kaninchen IgG	HRP	DAKO GmbH, Hamburg
Avidin	-	-	HRP	ThermoFisher Scientific, Darmstadt

ELISpot

Name	Klon	Isotyp	Konjugat	Firma
anti-IL-21	MT216G	Maus IgG1	-	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
anti-IL-21	MT21.3m	Maus IgG1	Biotin	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Streptavidin	-	-	ALP	Mabtech, Nacka Strand, Schweden

2.4 Zytokine

Name	Firma
Interleukin-2, rekombinant human	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Interleukin-2, rekombinant human	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Interleukin-4, rekombinant human	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
Interleukin-7, rekombinant human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Interleukin-17A, rekombinant human	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
Interleukin-21, rekombinant human	ThermoFisher Scientific, Darmstadt

2.5 Chemikalien

Name	Firma
2,2'-Azino-bis- (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS TM ; C ₁₈ H ₂₄ N ₆ O ₆ S ₄)	Calbiochem, San Diego, USA
BCIP/NBT-plus	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO; C ₂ H ₆ OS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Dulbecco's PBS (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
ELISA Assay Diluent 5X	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
ELISA Wash Buffer 10x	Eurolmmun, Lübeck
Ethanol 70%	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
FACSClean	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACSFlow	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACSRinse	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
fetales Kälberserum (FCS; FBS-Superior)	Biochrom AG, Berlin
gepooltes humanes Serum (PHS; Type AB)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Ionomycin	Calbiochem, San Diego, USA
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutamin (200mM) mit Penicillin (10.000U/ml), Streptomycin (10.000µg/ml)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Lymphocytes Separation Media	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Monensin (BD GolgiStop TM)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Pancoll, human	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Paraformaldehyd	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; C ₃₆ H ₅₆ O ₈)	Promega, Fitchburg, USA
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Polysorbat-20 (Tween [®] -20)	Merck KGaA, Darmstadt
2-Propanol (C ₃ H ₈ O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Rinderalbumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
RPMI 1640	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Tetramethylbenzidine (TMB)	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
Trypanblau-Lösung 0,4%	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Merck KGaA, Darmstadt

2.6 Puffer und Kulturmedien

Name	Herstellung
ABTS-Lösung	515 ml 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat + 485 ml 0,1 M Citronensäure pH auf 5,0 eingestellt + 1 g ABTS Lagerung bei -20 °C
Einfriermedium	FCS, sterilfiltriert (0,22 µm) + 10% DMSO Lagerung bei -20 °C
ELISA-Blockpuffer	ELISA-Wasch-Puffer + 5% Magermilchpulver
ELISA-Waschpuffer	H ₂ O + 10% ELISA Wash Buffer 10x
FACS-Puffer	PBS + 1% FCS Lagerung bei 4 °C
FACS-Saponin-Puffer	FACS-Puffer + 0,3% Saponin Lagerung bei 4 °C
H ₂ O	Leitungswasser Deionisation und Sterilfiltration mittels Reinstwassersystem Lagerung bei Raumtemperatur
H ₂ O (steril)	H ₂ O Sterilisation bei 121 °C, 20 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur
RPMI ⁺⁺	RPMI 1640 + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 2 mM Glutamin Lagerung bei 4 °C
RPMI ⁺⁺ + 10% FCS	RPMI ⁺⁺ + 10% FCS Sterilfiltration (0,22 µm) Lagerung bei 4 °C
RPMI ⁺⁺ + 10% PHS	RPMI ⁺⁺ + 10% PHS Sterilfiltration (0,22 µm) Lagerung bei 4 °C

2.7 Verbrauchsmaterial

Name	Firma
24-Well-Kulturplatte	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
96-Well-Rundboden-Kulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-Well-Flachboden-Platte (MaxiSorp®)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
96-Well-PVDF-Membran-Platte (MAIPSWU10)	Millipore GmbH, Schwalbach
Alexa Fluor 647 Labeling Kit	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
Blutentnahmeröhrchen, CPDA (Monovette®)	Sarstedt, Nürnbrecht
Blutentnahmeröhrchen, Serum-Gel (Monovette®)	Sarstedt, Nürnbrecht
Einfrieröhrchen (Cryotube)	Sarstedt, Nürnbrecht
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht
Pasteurpipetten	Hirschmann GmbH, Eberstadt
Polypropylen-Röhrchen (Falcons), 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäß (Eppi), 1,5 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Serologische Pipetten, 5/10/25 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Sterilfilter, 0,22µm (Steriflip)	Millipore GmbH, Schwalbach
Sterilfilter, 0,22µm (Stericup)	Millipore GmbH, Schwalbach
Sterilfilter, 0,45µm (Steritop)	Millipore GmbH, Schwalbach
Zellkulturflaschen, 25/75/125 cm ²	Sarstedt, Nürnbrecht

2.8 Geräte

Name	Firma
CO ₂ -Inkubator (BBD 6220)	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
CO ₂ -Inkubator (HERAcell®)	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Darmstadt
Durchflusszytometer (FACSCalibur™)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einfrierbehälter (Qualifreeze)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
ELISpot Scanner (ELI.Scan)	A.EL.VIS, Hannover
Kühlzentrifuge (Megafuge® 1.0R)	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Darmstadt
Laborautoklav, FVA3	Fedegari Autoclavi Spa, Albuzzano, Italien
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
pH-Meter CyberScan pH 510	Eutech Instruments Europe bv, Nijkerk, Niederlande
Plattenphotometer (Sunrise™-Basic)	Tecan GmbH, Gröding, Österreich
Reinstwassersystem (Astacus)	MembraPure GmbH, Hennigsdorf
Schüttelwasserbad (GFL 1083)	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Stickstofftank (Chronos 200)	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen

2.9 Software

Name	Firma
CellQuest Pro™ (5.2)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Citavi© (6.3)	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
Eli.Analyse ELISPOT Analysis Office Software (4.2)	A.EL.VIS, Hannover
FlowJo© (7.6.3)	TreeStar Inc, Ashland, USA
Fotografix© (1.5)	L.Madhavan
GraphPad Prism© (6.02)	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Microsoft© Office PowerPoint© (2013)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
TeXworks (0.4.5)	Jonathan Kew, Stefan Löffler, Charlie Sharpsteen

3. Methoden

3.1 Blutentnahmen

Für diese Arbeit wurde Blut von PV-Patienten sowie von gesunden Spendern durch das ärztliche Personal der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikum Giessen und Marburg (Standort Marburg) abgenommen. Für die Durchführung der Untersuchungen liegt ein positives Votum (Az: Studie 20/14) der Ethikkommission Marburg vor. Für die Separation von Blutzellen und Blutplasma wurde Blut in mit Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA)-Puffer versetzten Entnahmeröhrchen (CPDA-Blut) entnommen und im unmittelbaren Anschluss daran weiter verarbeitet.

3.2 Separation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes mittels Dichtegradientenzentrifugation

Prinzip

Bei der Dichtegradientenzentrifugation werden die zellulären Bestandteile des Blutes entsprechend ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennt. Dies ermöglicht die Separation von humanen PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) aus dem Blut der Patienten und Probanden. Blut, gemischt mit *phosphat buffered saline* (PBS), wird hierbei über ein Separationsmedium (wässrige Lösung bestehend aus hochpolymeren Zuckern mit einer definierten Dichte von 1,077 g/ml) geschichtet. Durch die anschließende Zentrifugation kommt es zur Sedimentation von Erythrozyten und Granulozyten, welche eine höhere Dichte besitzen, wobei sich Thrombozyten, Lymphozyten und Monozyten aufgrund ihres geringeren Dichteverhaltens das Separationsmedium nicht durchdringen und sich an der Grenzschicht zwischen PBS und dem Separationsmedium ansammeln (Abb.3.1). Diese Zellen werden anschließend gewonnen und durch weitere Zentrifugation die Thrombozyten entfernt. Die so gewonnenen PBMC bestehen zum größten Teil aus Lymphozyten und Monozyten.

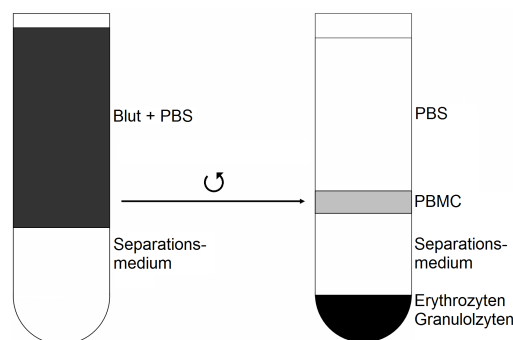


Abb. 3.1: Prinzip der PBMC-Separation mittels Dichtegradientenzentrifugation

CPDA-Blut wird zusammen mit PBS im Verhältnis 1:1 gemischt und auf ein Separationsmedium geschichtet. Durch Zentrifugation werden die PBMC (grau) aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte von den übrigen Blutzellen getrennt und können anschließend gewonnen werden.

Durchführung

CPDA-Blut wurde zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und 350 g zentrifugiert um Blutplasma und Blutzellen voneinander zu trennen. Das Plasma wurde anschließend abpipetiert, für 10 Minuten bei 1860 g, 4 °C zentrifugiert und zuletzt bei -20 °C eingefroren. Die Blutzellen wurden nun 1:1 mit PBS in einem Gesamtvolumen von 30 ml gemischt und vorsichtig über 15 ml des Separationsmediums geschichtet. Der so erstellte Dichtegradient wurde nun für 30 Minuten bei 450 g, RT zentrifugiert. Die Bremse der Zentrifuge wurde dabei deaktiviert um ein langsames Anfahren bzw. Auslaufen zu ermöglichen. Nach der Zentrifugation wurden die an der Grenzschicht zum Separationsmedium befindlichen PBMC mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in 50 ml PBS (4 °C) überführt. Die Zellen wurden zunächst bei 550 g und zuletzt nochmals bei 350 g für jeweils 10 Minuten bei 4 °C mit PBS gewaschen, in RPMI⁺⁺ aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (Abschnitt 3.4). Die so gewonnenen PBMC wurden nun direkt weiter verwendet, oder für eine spätere Verwendung bei -196 °C im Stickstoff eingefroren (Abschnitt 3.3).

3.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Prinzip

Durch das Einfrieren von Zellen und die Lagerung in flüssigen Stickstoff können viele lymphoide Zellen über einen langen Zeitraum gelagert werden. Die Zellen werden hierbei in einem Einfriermedium, bestehend aus fetalen Kälberserum (engl. *fetal calf serum*; FCS) mit Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO), aufgenommen und anschließend langsam (-1 °C pro Minute) auf eine Temperatur von -80 °C heruntergekühlt. Das DMSO wird hierbei den Zellen hinzugegeben, um die Bildung von zellschädigenden Eiskristallen beim Gefrieren der Proben zu verhindern.

Durchführung

Für das Einfrieren wurden die Zellen zunächst im jeweiligen Medium für 10 Minuten bei 350 g, 4 °C zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 350 g, 4 °C wurden die Zellen in FCS (4 °C) aufgenommen und 1:1 mit in Einfrierröhrchen vorgelegten Einfriermedium (4 °C) gemischt. Die Röhrchen wurden nun in einen Einfrierbehälter überführt und dabei Schrittweise (-1 °C pro Minute) auf -80 °C heruntergekühlt. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -196 °C im Stickstofftank. Es wurden 1 bis 10x10⁶ Zellen je Röhrchen eingefroren.

Für das Auftauen wurden die Einfriereröhrchen in ein Wasserbad (37 °C) überführt und so lange darin belassen bis keine Eiskristalle mehr zu sehen waren. Danach wurden die Zellen sofort tropfenweise in RPMI⁺⁺ (4 °C) überführt und 10 Minuten bei 350 g, 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in ihrem jeweiligen Wachstumsmedium aufgenommen und weiter kultiviert.

3.4 Zellzahlbestimmung

Prinzip

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität werden die Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau verdünnt, der an zytosolische Proteine toter Zellen bindet und zu einer dunkel blauen Färbung der Zellen führt, während er die Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringt (keine Färbung). So kann durch die Zählung der lebenden Zellen innerhalb eines definierten Volumens mit einer Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentration gemäß folgender Formel berechnet werden.

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zellen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Durchführung

Eine Einzelzellsuspension der jeweiligen Zellen wurde mit Trypanblau-Lösung (0,4%) verdünnt und 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Anschließend wurden die lebenden Zellen von zwei der vier Großquadrate ausgezählt und die Zellkonzentration mittels oben stehender Formel berechnet.

3.5 Fluoreszenzmarkierung von rekombinanten Desmoglein 3

Prinzip

Zur Detektion von autoreaktiven B-Zellen mittels Durchflusszytometrie erfolgte die Fluoreszenzmarkierung von rekombinanten humanen Dsg3 mit dem Fluorochrom AlexaFluor 647 (AF647). Das Dsg3-Protein wird hierbei mit dem reaktiven AF647-Fluorochrom, welches eine freie Succinimidyl-Ester-Gruppe enthält, zusammen mit einem Reaktionspuffer gemischt. Dabei erfolgt spontan die kovalente Bindung des Fluorochroms an die primären Amine des Dsg3. Durch anschließende chromatografische Säulenaufreinigung des Gemisches wird das markierte Dsg3 (Dsg3-AF647) von freien, unmarkierten Dsg3 getrennt.

Durchführung

Die Fluoreszenzmarkierung von Dsg3 erfolgte unter Verwendung des AlexaFluor647 Protein Labeling Kit gemäß den Herstellerangaben. Hierbei wurden pro Markierungsreaktion 1 mg rekombinantes Dsg3 (extrazelluläre Domäne; Aminosäuren 1-566) in 0,5 ml PBS gelöst, mit 50 µl 1 M Bicarbonatpuffer gemischt und anschließend dem reaktiven AF647-Fluorochrom hinzugegeben und im Dunkeln für 1 Stunde bei RT unter ständigen Rühren inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf eine mit Polyacrylamid-Beads (Bio-Rad BioGel P-30 *Fine size exclusion purification resin*) vorbereitete Säule gegeben und diese fortwährend mit Elutionspuffer (PBS +0,2 mM Natriumazid) gespült. Es kam nun zur Trennung des markierten Dsg3-AF647 von freien, unmarkierten Dsg3, wobei das Dsg3-AF647 als schnellere blaue Bande sichtbar wurde und zuletzt zu je 100 µl in Reaktionsgefäße aliquotiert und für die spätere Verwendung bei -20 °C eingefroren wurde.

3.6 Durchflusszytometrie

Prinzip

Die Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence-activated cell sorting*; FACS) ermöglicht die simultane Messung mehrerer Zellparameter einer einzelnen Zelle innerhalb einer Zellsuspension. Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer (BD FACSCalibur) besteht aus zwei Lasern spezifischer Wellenlänge (488 nm, 635 nm) und einer Optik aus verschiedenen Linsen und Prismen, welche die Laserstrahlen in einer feinen Küvette (sog. *flow-Zelle*) bündeln (Abb.3.2). Die zu messenden Zellen werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom vereinzelt und passieren anschließend den Laserstrahl. Dabei kommt es in Abhängigkeit von der Zellgröße zu einer vorwärtsgerichteten Streuung des Lichts (*Forward Scatter*; FSc). Daneben führen die verschiedenen Zellkompartimente, wie zum Beispiel Mitochondrien und Granula, zu einer seitwärts gerichteten Streuung (*Sideward Scatter*; SSc). Die beiden Streuungen (SSc und FSc) erlauben somit die Charakterisierung einer Zelle gemäß der Größe und der Granularität und werden durch entsprechend positionierte Detektoren gemessen. Zur weiteren Charakterisierung der Zellen werden diese zusätzlich mit monoklonalen Fluorochrom-markierten Antikörpern angefärbt. Diese sind spezifisch für einzelne extra- oder intrazelluläre Antigene (bspw. spezifische Oberflächenmoleküle von T- und B-Zellen oder Zytokine) und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches eine nachfolgende Zuordnung der pro Zelle detektierten Lichtsignalen zu dem jeweiligen Antigen erlaubt. Somit konnten insgesamt 4 Parameter gleichzeitig für jede einzelne Zelle bestimmt werden.

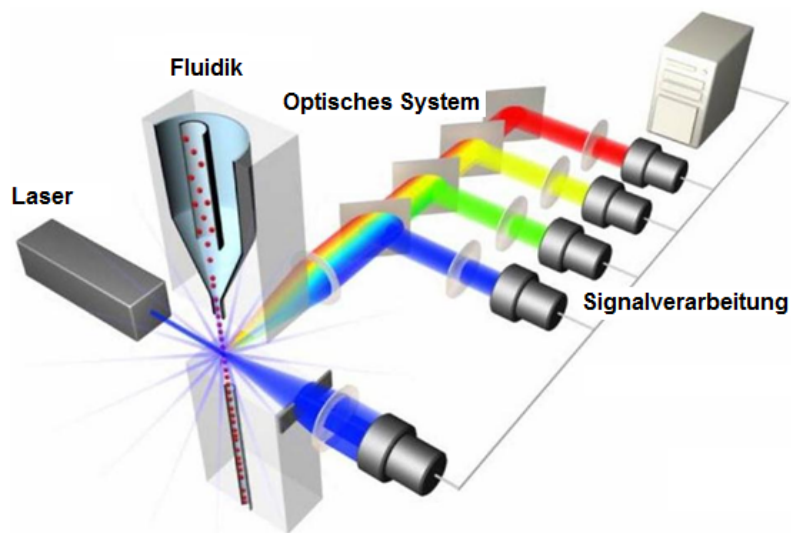


Abb. 3.2: Prinzip der Durchflusszytometrie (modifiziert nach Rowley, 2012)

Die zu messenden Zellen werden innerhalb der Fluidik zu einem laminaren Flüssigkeitsstrom vereinzelt und durch eine feine Küvette (*flow-Zelle*) gepumpt. Dabei werden sie von einer Lichtquelle (Laser) bestrahlt. Die durch die Form und Größe der Zellen hervorgerufene Streuung des Lichts sowie die emittierte Fluoreszenz der Zellen, die zuvor mit Fluorochrom-markierten antigenspezifischen Antikörpern angefärbt wurden, wird durch das optische System erfasst, spektral gefiltert und durch Photodetektoren in elektronische Signale zur weiteren computergestützten Signalverarbeitung umgewandelt.

Färbung von zirkulierenden Tfh-Zellen

Durchführung

PBMC wurden in FACS-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 535 g, 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten bei 535 g, 4 °C gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die entsprechenden FACS-Antikörper (anti-CD4-FITC, anti-CXCR5-PerCP-Cy5.5, anti-ICOS-PE, anti-PD-1-APC; siehe Abschnitt 2.3) sowie in separaten Ansätzen Isotypkontrollen zu 100 µl Restvolumen hinzugegeben. Es folgte die Inkubation für 20 Minuten im Dunkeln bei 4 °C. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1 ml FACS-Puffer für 5 Minuten bei 535 g, 4 °C gewaschen und zuletzt in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die gefärbten Zellen wurden bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gehalten.

Zytokinfärbung von CD4⁺ T-Zellen nach *in-vitro* Stimulation

Durchführung

Kryokonservierte PBMC wurden zunächst aufgetaut (Abschnitt 3.3), in RPMI⁺⁺ + 10% FCS aufgenommen, gezählt (Abschnitt 3.4) und im Anschluss insgesamt 5×10^6 Zellen zu jeweils 1×10^6 Zellen/well in 0,5 ml Gesamtvolumen in eine 48-Well-Platte gegeben über Nacht bei 37 °C, 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden anschließend in FACS-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 535 g, 4 °C mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden in RPMI⁺⁺ + 10% FCS resuspendiert und 5 ng PMA, 500 ng Ionomycin als Stimulation sowie Monensin (1:1500) zur Blockade der zellulären Zytokinsekretion hinzugegeben. Ein Teil der Zellen wurde unstimuliert belassen. Nach 5 Stunden Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ wurden die Zellen zweimal mit 1 ml FACS-Puffer für 5 Minuten bei 535 g, 4 °C gewaschen, der Überstand dekantiert und anschließend anti-CD4-FITC in 100 µl Restvolumen hinzugegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen einmalig mit FACS-Puffer und anschließend mit PBS für jeweils 5 Minuten bei 535 g, 4 °C gewaschen. Es erfolgte die Fixierung der Zellen durch Inkubation für 10 Minuten mit PBS + 1% Paraformaldehyd bei RT im Dunkeln. Überschüssiges Paraformaldehyd wurde anschließend durch Waschen mit 2 ml FACS-Puffer für 5 Minuten bei 535 g, 4 °C entfernt. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch Zugabe von 2 ml FACS-Saponin-Puffer und erneuter Zentrifugation für 5 Minuten bei 535 g, 4 °C. Es wurden nun die gegen Zytokine gerichteten FACS-Antikörper (anti-IL-4-APC o. anti-IL-10-APC, o. anti-IL-17A-AF647 zusammen mit anti-IL-21-PE; siehe Abschnitt 2.3) in 100 µl Restvolumen zu den stimulierten Proben bzw. unstimulierten Proben als Kontrolle hinzugegeben und für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen zweimal mit 1 ml FACS-Puffer für 5 Minuten bei 535 g, 4 °C gewaschen und in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die gefärbten Zellen wurden bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gehalten. Die verwendete *gating*-Strategie kann Abbildung 3.3 entnommen werden.

Färbung von Dsg3-spezifischen B-Zellen

Durchführung

PBMC von Patienten und gesunden Kontrollen oder murine B-Zell-Hybridomzellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 535 g, 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden

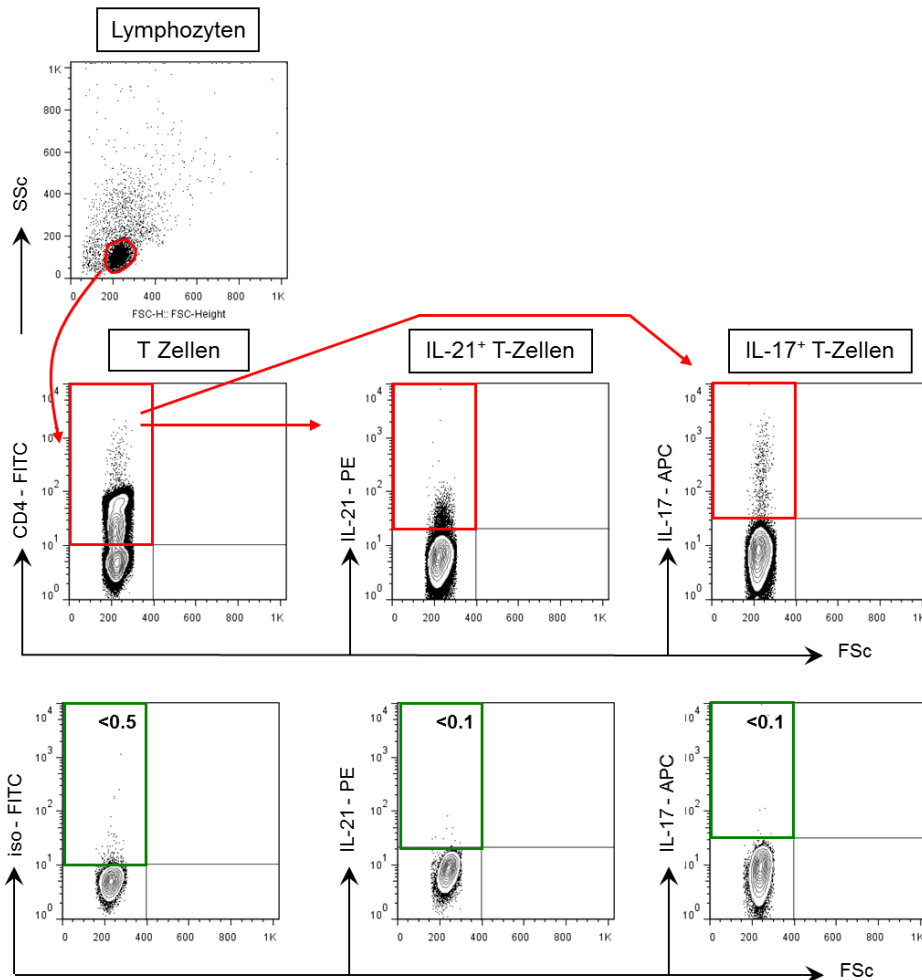


Abb. 3.3: *gating*-Strategie zur Bestimmung der Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen

Es wurden mit PMA, Ionomycin und Monensin stimulierte PBMC für die Analyse verwendet. Lymphozyten wurden zunächst im SSc/FSc-Plot identifiziert und anschließend CD4⁺ T-Zellen *gated*. Anschließend konnte die Zytokinproduktion innerhalb der CD4⁺ T-Zellen (hier Färbungen für IL-21 und IL-17 exemplarisch dargestellt) bestimmt werden. Die Definition von CD4⁺ T-Zellen erfolgte anhand der entsprechenden Isotypkontrolle. Zur Bestimmung des *gatings* von IL-21- und IL-17-positiven Zellen wurden unstimulierte Zellen, die mit den jeweiligen Antikörpern gefärbt wurden, verwendet. SSc, *sideward scatter*; FSc, *forward scatter*.

die Zellen in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten bei 535 g, 4 °C gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die entsprechenden FACS-Antikörper (anti-human: anti-CD19-PerCP-Cy5.5, anti-CD27-PE und anti CD38-FITC; anti-maus: anti-IgG-AF647) zusammen mit Dsg3-AF647 sowie separaten Isotypkontrollen (siehe 2.3) zu 100 µl Restvolumen hinzugegeben. Es folgte die Inkubation für 20 Minuten im Dunkeln bei 4 °C. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1 ml FACS-Puffer für 5 Minuten bei 535 g, 4 °C gewaschen und zuletzt in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die gefärbten Zellen wurden bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gehalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Dsg3-spezifische B-Zellen durch Verwendung von Dsg3-AF647 innerhalb von PBMC von PV-Patienten und gesunden Kontrollpersonen angefärbt. Dafür wurden fluoreszenzgekoppelte Antikörper gegen mehrere Oberflächenantigene verwendet, die eine Einteilung der B-Zellen in verschiedene Subtypen erlauben. Die hierbei verwendete *gating*-Strategie kann Abbildung 3.4 entnommen werden.

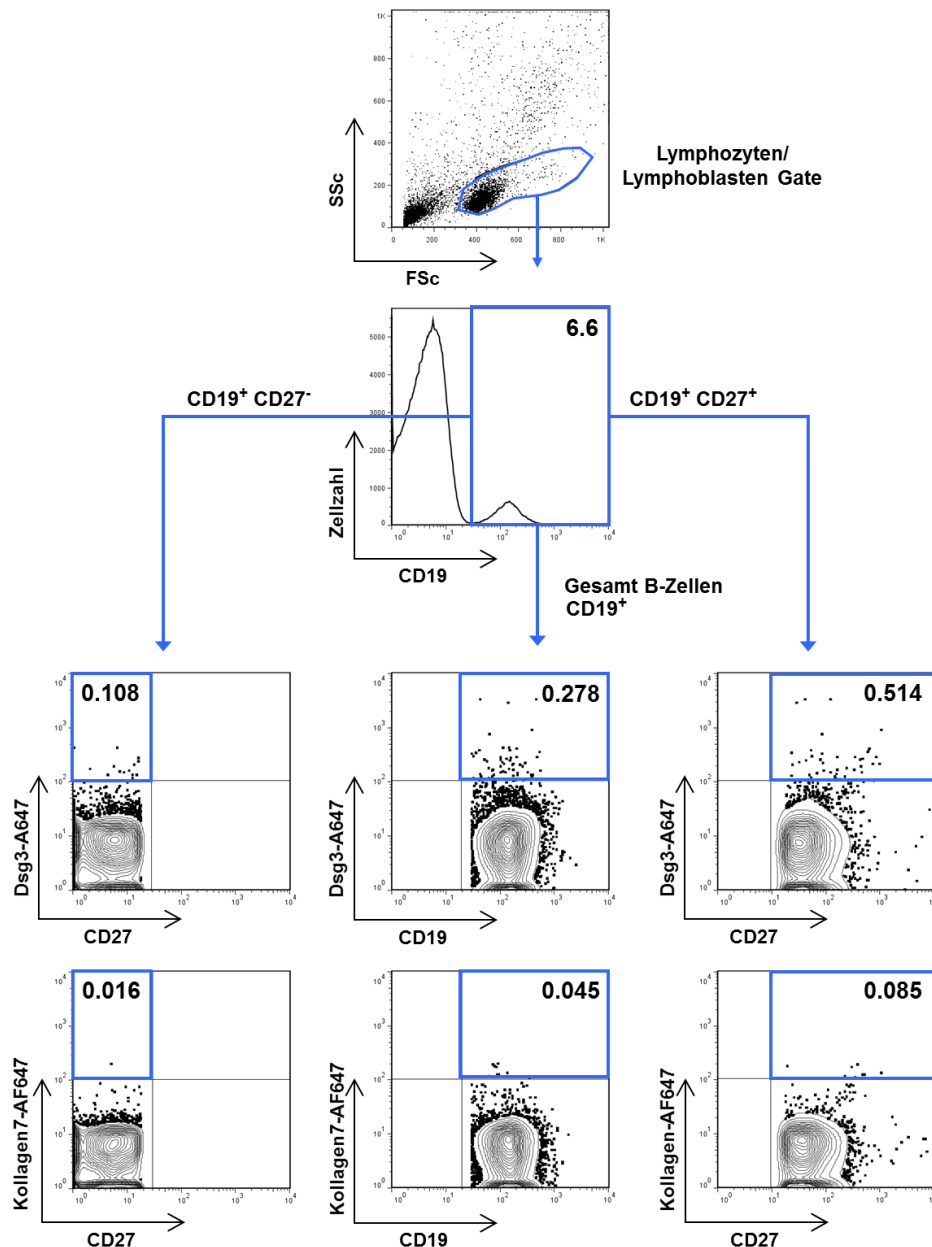


Abb. 3.4: gating-Strategie zur Charakterisierung von Dsg3-spezifischen B-Zellen

Lymphozyten und Lymphoblasten wurden zunächst im SSC/FSc-Plot *gated* und der Anteil an CD19⁺ B-Zellen bestimmt. Anschließend konnten Dsg3-AF647 positive B-Zellen gemäß ihrer Expression von CD27 und CD38 in die Subpopulationen CD19⁺CD27⁻ (links) und CD19⁺CD27⁺ (rechts) eingeteilt werden. Die Definition des *gatings* von Dsg3-spezifischen B-Zellen erfolgte unter Einbeziehung des fluoreszenzmarkierten Kontrollproteins Kollagen7-AF647. Es wurden nur jene Zellen mit einem starken Fluoreszenzsignal für die Analyse verwendet. AF647, AlexaFluor647; FSc, forward scatter; SSC, sideward scatter.

Messung am Durchflusszytometer

Die Messung der Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur™ und der Software CellQuest Pro™ durchgeführt. Dabei wurden im betrachteten Lymphozytengate jeweils 50.000 Zellen (Isotypkontrollen, Einzelfärbungen, B-Zell-Hybridome) bzw. mindestens 250.000 Zellen (Mehrfachfärbungen PBMC) gezählt. Die Auswertung der Messwerte erfolgte anschließend mit dem Programm FlowJo®.

3.7 Detektion von IL-21-produzierenden autoreaktiven T-Zellen mittels ELISpot

Prinzip

Der *enzyme-linked immunospot assay* (ELISpot) ermöglicht die quantitative Detektion von einzelnen Zellen die ein bestimmtes Analyt (hier das Zytokin IL-21) sezernieren. Im Gegensatz zum ELISA bei dem, wie in dieser Arbeit durchgeführt, die Gesamtkonzentration von IL-21 innerhalb des Blutplasmas bestimmt wird (Abschnitt 3.10), können mittels ELISpot die Anzahl von IL-21-sezernierenden Zellen innerhalb einer Zellpopulation quantifiziert werden. Das Prinzip des in dieser Arbeit verwendeten ELISpots ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Der assay besteht hierbei aus 4 Arbeitsschritten. (1) Die Beschichtung einer Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran mit einem anti-IL-21 *coating*-Antikörper. (2) Die Kultur der zu untersuchenden Zellen auf der PVDF-Membran. Dabei kommt es zur Bindung von IL-21 an den Detektionsantikörper. (3) Die Detektion der gebundenen Antikörper durch Zugabe eines biotinylierten anti-IL-21-Detektionsantikörpers gefolgt von der Zugabe von mit dem Enzym Alkalischer Phosphatase (ALP) konjugierten Streptavidin. (4) Die Entwicklung des assays durch die Zugabe einer Substratlösung. Hierbei kommt es an den Stellen der Membran an dem sich IL-21-sezernierende Zellen befunden haben zur Präzipitation des Farbreagens. IL-21-spezifische Zellen werden somit als einzelne *spots* sichtbar und können anschließend ausgezählt werden.

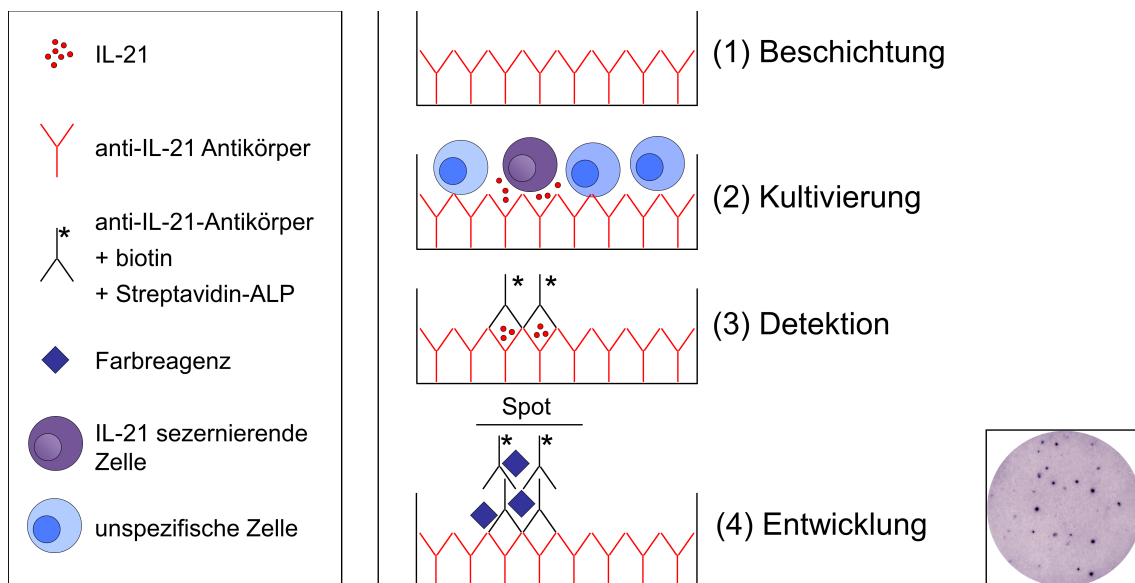


Abb. 3.5: Prinzip des ELISpots zur Detektion von IL-21-produzierenden T-Zellen

(1) Eine PVDF-Membran wird mit einem anti-IL-21-Antikörper beschichtet. (2) Zellen werden auf der Platte kultiviert, das dabei sezernierte IL-21 bindet an den anti-IL-21-Antikörper. (3) Die Zellen werden durch Waschen der Platte entfernt und das gebundene IL-21 mit einem biotinylierten anti-IgG-Detektionsantikörper zusammen mit Streptavidin-ALP detektiert. (4) Durch die Zugabe einer Substratlösung kommt es zur Farbreaktion und zur Entwicklung von auszählbaren *spots*.

Durchführung

Kryokonservierte PBMC von Patienten wurden zunächst aufgetaut (siehe 3.3) und im Anschluss in RPMI⁺⁺ + 10% PHS aufgenommen. Die Zellzahl wurde bestimmt (siehe 3.4) und insgesamt 6×10^6 Zellen zu jeweils 1×10^6 Zellen/well in 1 ml Gesamtvolumen in eine 48-Well-Platte gegeben. Zu 2×10^6 PBMC wurden 10 µg/ml rekombinantes Dsg3 zur Stimulationen von autoreaktiven Dsg3-spezifischen T-Zellen hinzugegeben. Daneben erfolgte als unspezifische Kontrolle eine Stimulation von 2×10^6 PBMC mit 10 µg/ml rekombinanten Kollagen7. Weitere 2×10^6 PBMC verblieben unstimuliert. Die Zellen wurden im Anschluss bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Zur Expansion der antigenspezifisch stimulierten T-Zellen erfolgte nach 48 Stunden die Zugabe von 10 U/ml Interleukin-2 (Roche) und 10 ng/ml Interleukin-7 (Miltenyi Biotec) bei allen Ansätzen. Nach 7 Tagen in Kultur wurden die Zellen geerntet, einmalig zentrifugiert (350 g, 10 Minuten, RT), und wieder in RPMI⁺⁺ + 10% PHS aufgenommen und im Anschluss pro Ansatz (Dsg3, Kollagen7, unstimuliert) 5×10^5 Zellen oder 1×10^5 PBMC Zellen in Doppelbestimmung auf eine zuvor beschichtete 96-Well-PVDF-Membran-Platte gegeben. Dabei wurden die zuvor stimulierten Zellen erneut mit Dsg3 oder Kollagen7 (jeweils 10 µg/ml) restimuliert bzw. unstimuliert belassen und für 20 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Restliche Zellen wurden zusätzlich als Positivkontrolle mit PHA in Doppelbestimmung stimuliert. Für das Beschichten wurde die Membran einer 96-Well-PVDF-Membran-Platte zunächst durch die Zugabe von 50 µl/Well Ethanol (70%) für 1 Minute befeuchtet und anschließend fünfmal mit 200 µl/Well H₂O (steril) gewaschen. Danach wurden 100 µl/Well anti-IL-21 (MT216G; 10 µg/ml in PBS) hinzugegeben und die Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde nun fünfmal mit 200 µl/Well PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl/Well RPMI⁺⁺ + 10% FCS für mindestens 30 Minuten bei RT geblockt. Das Medium wurde verworfen und im Anschluss die Zellen aus den oben beschriebenen Stimulationsansätzen hinzugegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Membran fünfmal mit 200 µl/Well PBS gewaschen. Es erfolgte die Inkubation mit 100 µl/Well des biotinylierten anti-IL-21 Detektionsantikörpers (MT21.3m; 0,25 µg/ml in PBS + 0,5% FSC) für 2 Stunden bei RT. Die Membran wurde erneut mit PBS gewaschen (siehe oben) und mit Streptavidin-ALP (1:1000 in PBS + 0,5% FSC) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Es erfolgte ein letzter Waschschrift mit PBS (siehe oben). Anschließend wurden 100 µl/Well der sterilfiltrierten (0,45 µm) Substratlösung (BCIP/NBT-plus) hinzugegeben und die Membran im Dunkeln entwickelt bis deutliche *spots* sichtbar wurden (10-20 Minuten). Die Membran wurde mit Leitungswasser gewaschen und über Nacht im Dunkeln getrocknet. Danach wurden die *spots* quantitativ mit Hilfe eines automatisierten ELISpot Scanners detektiert und ausgezählt. Die Anzahl von Dsg3-spezifischen IL-21-produzierenden Zellen wurde durch Abzug der Mittelwerte der mit dem Kontrollprotein Kollagen7 erzielten *spot*-Zahlen ermittelt.

3.8 Kultivierung von murinen B-Zell-Hybridomzellen

Durchführung

B-Zell-Hybridomzellen wurden in RPMI⁺⁺ + 10% FCS in Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5% CO₂ kultiviert. Die Zelldichte betrug 0,1 bis $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml. Die Zellen wurden täglich mikroskopiert und gesplittet sobald die Zelldichte überschritten bzw. der pH-Wert des Mediums sauer wurde (orange-gelber Farbumschlag des Phenolrot-pH-Indikators).

3.9 Subklonierung von Hybridomzelllinien

Durchführung

Um einzelne Dsg3-spezifische B-Zell-Klone aus den verwendeten B-Zell-Hybridomzelllinien zu erhalten wurden diese mittels Grenzwert-Verdünnung subkloniert. Hierfür wurden die in Zellkulturflaschen befindlichen Zellen zunächst geerntet, danach einmalig zentrifugiert (300 g, 10 Minuten, RT) und im Anschluss in RPMI⁺⁺ + 10% FCS aufgenommen. Es wurde die Zellzahl bestimmt (Abschnitt 3.4) und die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Eine korrekt eingestellte Zellzahlkonzentration wurde durch erneutes Bestimmen der Zellzahl überprüft und die Verdünnung der Zellen im Anschluss ggf. angepasst. Anschließend wurden die Zellen über eine 6-stufige Verdünnungsreihe auf eine Endkonzentration von $0,33 \times 10^1$ Zellen/ml eingestellt und jeweils 100 µl/Well (dies entspricht 0,33 Zellen pro Well) auf acht 96-Well Zellkulturplatten (insg. 768 einzelne Wells) ausplattiert. Das Gesamtvolumen wurde zuletzt auf 200 µl aufgefüllt. Statistisch gesehen wird durch dieses Vorgehen das Wachsen eines einzelnen B-Zell-Klons in jedem dritten Well erreicht. Die Platten wurden bei 37 °C, 5% CO₂ kultiviert und regelmäßig mikroskopisch begutachtet, um das Wachsen einzelner Klone beobachten zu können, welches abhängig vom jeweiligen Experiment nach etwa einer Woche der Fall war. Die Überstände der Wells einzelner B-Zell-Klone wurden nachfolgend für die Bestimmung der Dsg3-Antigenspezifität mittels ELISA verwendet.

3.10 Detektion von Antikörpern und Zytokinen ELISA

Prinzip

Mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten ELISA-Systeme können die Menge von Dsg3-Antikörpern in Seren und Zellkulturüberständen sowie die Konzentration der Zytokine IL-4, IL-17 und IL-21 im Blutplasma bestimmt werden. Das Prinzip beruht auf der Bindung der Analyte an eine Flachboden-Platte, welche zuvor mit Dsg3 oder Antikörpern, die spezifisch für die zu bestimmenden Zytokine sind, beschichtet wurde. Durch die Zugabe eines mit HRP (engl. *horse radish peroxidase*) konjugierten Detektionsantikörpers zusammen mit einer darauf folgenden Substratlösung kann die Menge des Analyts durch die photometrische Messung des Farbumschlags bestimmt werden.

Bestimmung von humanen anti-Dsg1- und Dsg3-Antikörpern

Durchführung

Die Bestimmung der Titer von zirkulierenden Dsg1- und Dsg3-Autoantikörper vom Typ IgG im Serum der PV-Patienten oder gesunden Kontrollen erfolgte unter Verwendung des Anti-Desmoglein 1 bzw. 3-ELISA (EUROIMMUN) nach Herstellerangaben. Der ELISA mit Seren der Patienten wurden hierbei von den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Diagnostiklabors im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführt.

Bestimmung von murinen anti-Dsg3-Antikörpern

Durchführung

Zur Bestimmung von anti-Dsg3-Antikörpern in den Überständen einzelner B-Zell-Hybridomzelllinien und B-Zell-Klone wurde eine 96-Well-Flachboden-Platte mit 50 µl/Well Dsg3 (10 µg/ml in PBS + 0,5 mM CaCl₂) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platte wurde anschließend fünfmal mit 100 µl/Well ELISA-Waschpuffer gewaschen und 100 µl/Well ELISA-Blockpuffer für 1 Stunde bei RT hinzugegeben. Der Blockpuffer wurde verworfen, die Platte einmalig wie oben beschrieben gewaschen und 100 µl/Well des zu testenden Überstands hinzugegeben. Daneben erfolgte die Zugabe von nur Blockpuffer (Negativkontrolle) oder anti-Etag-Antikörper (1:2000), mit dem die Bindung des Dsg3-Proteins auf der Flachboden-Platte überprüft werden konnte, als Positivkontrolle. Es folgte die Inkubation für 1 Stunde bei RT. Danach wurde die Platte fünfmal mit 100 µl/Well Wasch-Puffer gewaschen und anschließend 50 µl/Well des jeweiligen HRP konjugierten Detektionsantikörper (anti-Maus-IgG; 1:2000 / anti-Kaninchen-IgG; 1:2000) in Blockpuffer hinzugegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Es erfolgte ein letzter Waschschrift mit 100 µl/Well Wasch-Puffer. Schließlich wurden 50 µl/Well ABTS-Lösung mit 0,006% H₂O₂ hinzugegeben, 30 Minuten im Dunkeln inkubiert und der Farbumschlag photometrisch bei 405 nm gemessen.

Bestimmung von Zytokinen

Durchführung

Die Konzentrationsbestimmung der Zytokine IL-4, IL-17 und IL-21 im Blutplasma von Patienten und gesunden Kontrollen erfolgte durch Verwendung des Human IL-4 / IL-17 / IL-21 ELISA Ready-SET-Go! Systems (ThermoFisher Scientific, Darmstadt). Der vom Hersteller angegebene Grenzwert für die Zytokinbestimmung liegt bei 2 pg/ml (IL-4), 4 pg/ml (IL-17) und 8 pg/ml (IL-21).

3.11 Statistik

Die in den Abbildungen dieser Arbeit dargestellten Messwerte der Patienten und Kontrollen sind kumulativ als *Boxplot* mit Angabe des Medians und des oberen 25%- und unteren 75%-Quartils dargestellt. Über den Bereich des *Boxplots* hinausgehende Messwerte sind als einzelne Datenpunkte angegeben. In einzelnen Abbildungen sind dagegen die individuellen Messwerte als Streudiagramm (engl. *scatter dot plot*) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des nicht parametrischen zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. Ein statistischer Zusammenhang einzelner Messparameter untereinander (Korrelation) wurde durch Berechnung des Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten (r_s) bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde bei beiden statistischen Tests mit $\alpha=0,05$ festgesetzt. Es ergaben sich somit signifikante Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p<0,05$. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die adaptive Autoimmunantwort beim PV näher charakterisiert. Hierfür wurden PBMC von insgesamt 24 PV-Patienten verwendet (Abschnitt 4.1). Es erfolgten zum einen Untersuchungen an CD4⁺ T-Zellen im Hinblick auf die Produktion des Zytokins IL-21 und der Verteilung von Tfh-Zellen (Abschnitt 4.2). Darüber hinaus wurde ein durchflusszytometrisches Testsystem zur Detektion von autoreaktiven B-Zellen mit fluoreszenzmarkierten Dsg3-Protein etabliert (Abschnitt 4.3) und im Anschluss die Verteilung von Dsg3-spezifischen B-Zellen im peripheren Blut von PV-Patienten bestimmt (Abschnitt 4.4).

4.1 Patientencharakteristik der untersuchten PV-Patienten

Die zu untersuchenden immunologischen Parameter wurden in einem Kollektiv aus insgesamt 24 PV-Patienten mit individuell unterschiedlichem Krankheitszustand untersucht (Abb.4.1). Die Diagnose erfolgte anhand etablierter Kriterien, d.h. auf Basis des klinischen Erscheinungsbildes sowie des histologischen und immunserologischen Befunds.

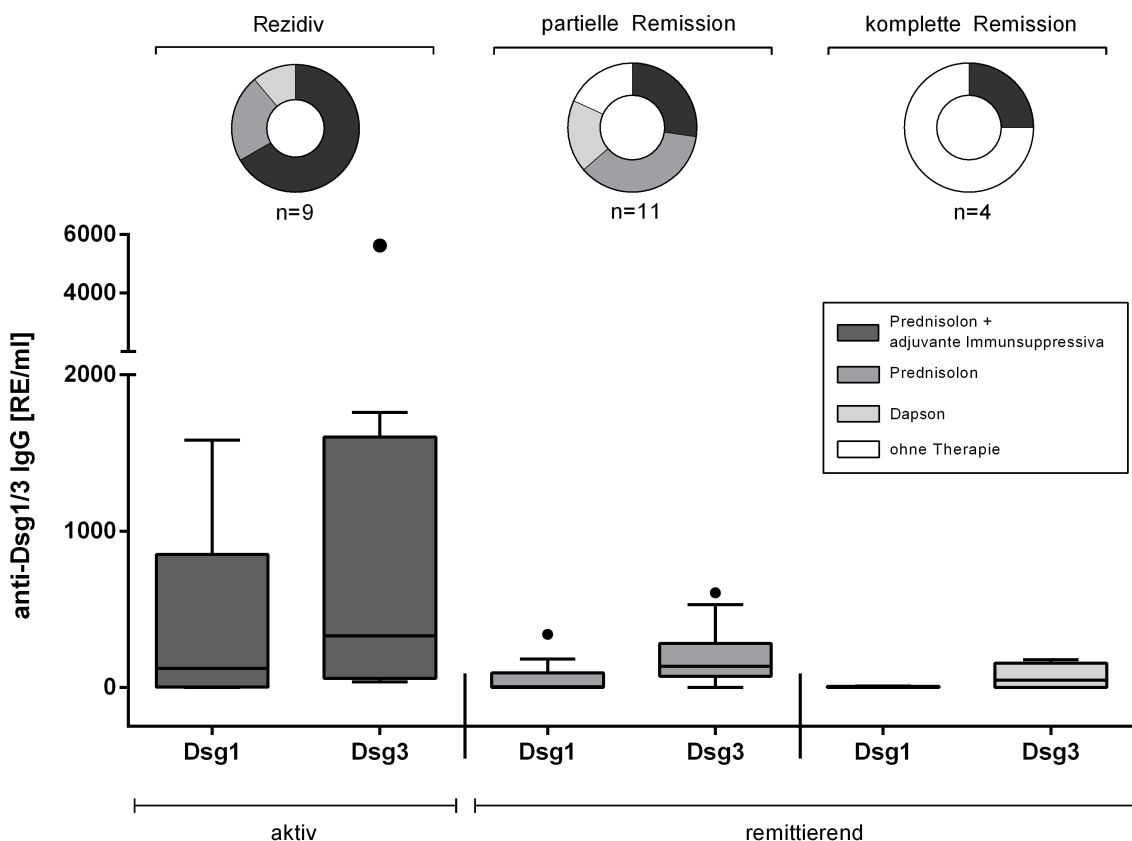


Abb. 4.1: Desmoglein (Dsg)1- und Dsg3-Autoantikörper und Therapie der untersuchten Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten. (Unten) Darstellung der Serumkonzentrationen von anti-Dsg1- und anti-Dsg3 IgG bei den in dieser Arbeit untersuchten PV-Patienten (n=24), unterteilt in Patienten mit Rezidiv (aktiv) und Patienten in partieller oder kompletter Remission (remittierend). (Oben) Die immunsuppressive Medikation ist zusammenfassend für die 3 Untergruppen dargestellt. RE, relative Einheiten.

Eine detaillierte Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten PV-Patienten kann dem Anhang (Tab.1 & 2, S.84ff.) entnommen werden. Es wurden Patienten mit einer aktiven Erkrankung in Form eines Rezidivs sowie Patienten mit verminderter Krankheitsaktivität in partieller oder kompletter Remission gemäß etablierter klinischer Kriterien (Murrell et al., 2008) eingeschlossen. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden PV-Patienten mit Rezidiv als *aktiv* und PV-Patienten in partieller oder kompletter Remission zusammenfassend als *remittierend* bezeichnet. Patienten mit Rezidiv (n=9) zeigten eine ausgeprägte klinische Manifestation des PV mit individuell stark ausgeprägter Haut- und Schleimhautbeteiligung sowie stark erhöhten Konzentrationen von anti-Dsg1- und anti-Dsg3 IgG im Serum. PV-Patienten mit partieller Remission (n=11) hatten nur noch vereinzelt vorkommende Blasen bzw. Erosionen, die vorrangig an den Schleimhäuten auftraten. Dsg1- und Dsg3-Autoantikörper waren hier im Vergleich zu aktiven Patienten deutlich verringert. Patienten in kompletter Remission (n=4) waren frei von jeglichen Blasen an Haut- und Schleimhäuten und hatten keine oder lediglich niedrige Serumkonzentrationen von Dsg1- und Dsg3-Autoantikörpern. PV-Patienten mit Rezidiv erhielten eine immunsuppressive Behandlung vorrangig in Form von Kortikosteroiden (Prednisolon) und zum Teil zusätzlichen adjuvanten Immunsuppressiva (Mycophenolat-Mofetil (MMF), Azathioprin; Abb.4.1), wobei deutlich geringere Dosen bei remittierenden Patienten zum Einsatz kamen. Die Mehrheit der Patienten mit kompletter Remission (3 von 4) war frei von jeglicher immunsuppressiven Behandlung.

4.2 Untersuchung von IL-21 und Tfh-Zellen bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort von Patienten mit PV

In diesem Teil der Arbeit wurde eine mögliche pathogenetische Rolle des Zytokins IL-21 und Tfh-Zellen bei PV-Patienten näher betrachtet. Hierbei wurden zunächst die Konzentrationen von IL-21 im Plasma (Abschnitt 4.2.1 ff.) sowie die Produktion von IL-21 durch CD4⁺ T-Zellen mit Hinblick auf den Krankheitszustand der Patienten und vergleichend zu gesunden Kontrollen untersucht (Abschnitt 4.2.3 ff.) Daneben wurde analysiert inwiefern autoreaktive T-Zellen, die sich gegen Dsg3 als Hauptautoantigen des PV richten, in der Lage sind, IL-21 zu produzieren (Abschnitt 4.2.5). Zusätzlich erfolgte die Bestimmung und phänotypische Charakterisierung von zirkulierenden Tfh-Zellen im Kollektiv der PV-Patienten.

4.2.1 Zytokinkonzentration von IL-4, IL-17 und IL-21 im Plasma von Patienten

Um eine mögliche Beteiligung von Tfh-Zellen bei der Autoimmunantwort von PV-Patienten beurteilen zu können, wurden in einem ersten Schritt die Konzentration von IL-21, als Tfh-Markerzytokin, sowie die Konzentration der Zytokine IL-4 und IL-17 als Markerzytokine für Th2- und Th17-Zellen, im Plasma der Patienten mittels ELISA (Abschnitt 3.10) bestimmt.

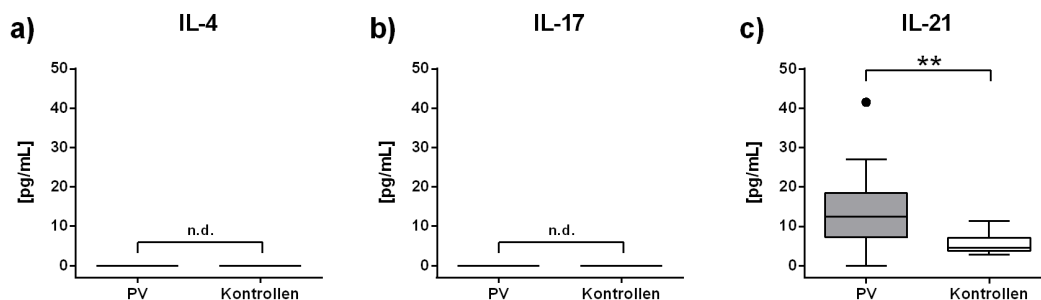


Abb. 4.2: Zytokinkonzentrationen von Interleukin(IL)-4, IL-17 und IL-21 im Plasma von Patienten und Kontrollen. Die Plasmakonzentration der Zytokine Interleukin (IL)-4, IL-17 und IL-21 wurden mittels ELISA (Abschnitt 3.10) im Kollektiv der PV-Patienten (n=24) und bei den Kontrollen (n=12) bestimmt. Der Grenzwert für die Zytokinbestimmung beträgt 2 pg/ml (IL-4), 4 pg/ml (IL-17) und 8 pg/ml (IL-21). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. ** $p < 0,01$. n.d., nicht detektierbar.

Hierbei konnte kein IL-4 und IL-17 im Plasma von PV-Patienten und Kontrollen gemessen werden (Abb.4.2a-b). Die Zytokinkonzentrationen wurden beim verwendeten ELISA mit einer Sensitivität von >2 pg/ml (IL-4) und >4 pg/ml (IL-17) bestimmt, so dass eventuell niedrigere vorliegende Plasmakonzentrationen nicht detektierbar waren. Im Gegensatz hierzu war IL-21 bei PV-Patienten (Median: 12,4 pg/ml) und Kontrollen im Plasma (Median: 4,5 pg/ml) vorhanden, wobei bei PV-Patienten deutlich höhere Konzentrationen (Max.: 41,5 pg/ml) detektiert werden konnten (Abb.4.2c). Dieser Befund zeigte somit ein verstärktes Vorkommen von IL-21 im Blut von PV-Patienten auf. Eine direkte Assoziation des erhöhten IL-21 mit dem klinischen Krankheitszustand (aktiv bzw. remittierend) zeigte sich bei den PV-Patienten nicht (Abb.4.3a). Auffällig waren hierbei jedoch ein individuell stark unterschiedlich ausgeprägtes Vorkommen von IL-21

bei remittierenden PV-Patienten (Max.: 41,5 pg/ml; Min.: 0 pg/ml), welche im Vergleich zu den gesunden Kontrollen noch keine statistische Signifikanz erreichte ($p = 0,08$), wohingegen IL-21 bei allen Patienten mit aktivem Krankheitszustand erhöht vorlag. Eine Korrelation von IL-21 mit Dsg1- bzw. Dsg3-Autoantikörpern konnte nicht beobachtet werden (Abb.4.3b-c).

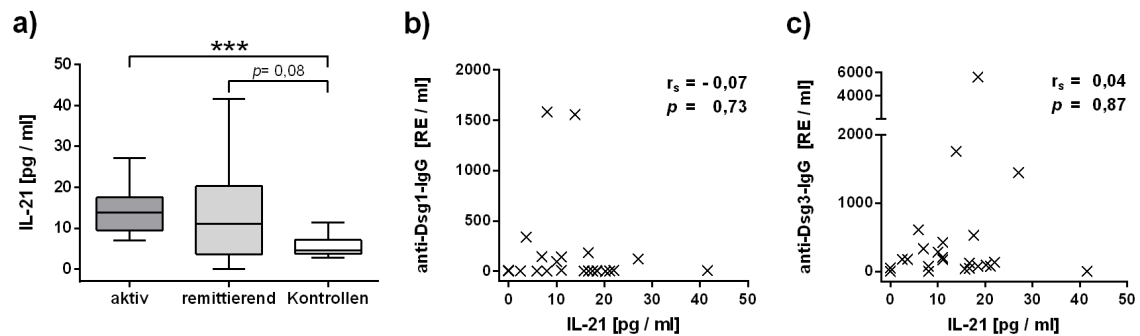


Abb. 4.3: Untersuchung der Abhängigkeit der Interleukin (IL)-21 Plasmakonzentrationen vom Krankheitszustand und Autoantikörpern. (a) Dargestellt sind die IL-21 Plasmakonzentrationen im Kollektiv der PV-Patienten (unterteilt in aktiv ($n=9$) und remittierend ($n=15$)) sowie Kontrollen ($n=12$)). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. $***p < 0,001$. (b-c) IL-21 im Plasma von PV-Patienten ($n=24$) wurde hinsichtlich einer Korrelation mit anti-Dsg1 und anti-Dsg3 IgG im Serum untersucht. Angegeben sind die Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten (r^s) und statistische Signifikanzen (p -Wert). RE, relative Einheiten.

4.2.2 IL-21 Plasmakonzentrationen im Krankheitsverlauf

Um eine mögliche Rolle von IL-21 bei der Pathogenese des PV näher beurteilen zu können, wurde IL-21 bei zwei PV Patienten (PV2 und PV17), deren asserviertes Plasma aus vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe vorlag, in einem längeren zeitlichen Verlauf von 60 Wochen untersucht. Diese beiden Patienten erfuhren im Laufe des Beobachtungszeitraums ein klinisches Rezidiv des PV, welches anschließend immunsuppressiv behandelt wurde. Dabei kam es zu einem starken Abfall der zuvor hochtitrigen Dsg3-Autoantikörper im Plasma beider Patienten, der mit einer deutlichen Verbesserung des klinischen Hautbefundes einherging. In Abbildung 4.4 sind die erhobenen Konzentrationen von IL-21 und die Dsg3-Autoantikörper im zeitlichen Verlauf für beide Patienten gegenüber gestellt. Dabei zeigte sich, dass die IL-21 Plasmakonzentrationen größeren Schwankungen im zeitlichen Verlauf unterworfen waren. So konnten bei beiden Patienten die höchsten Konzentrationen von IL-21 während der Phase des klinischen Rezidivs bei gleichzeitig hohen Dsg3-Autoantikörpern im Plasma beobachtet werden, wobei die maximale IL-21 Konzentration individuell unterschiedlich hoch ausfiel (56,1 pg/ml (PV2); 22,0 pg/ml (PV17)). Nach Einleitung der immunsuppressiven Therapie kam es zu einem raschen Abfall von IL-21, der mit einer nachfolgenden Verringerung von Dsg3-Autoantikörpern einherging. Weiterhin war bei Patient PV17 (4.4b) die Konzentration von IL-21 bereits vor Manifestation des klinischen Rezidivs erhöht (18,8 pg/ml) und stieg im weiteren zeitlichen Verlauf zusätzlich an.

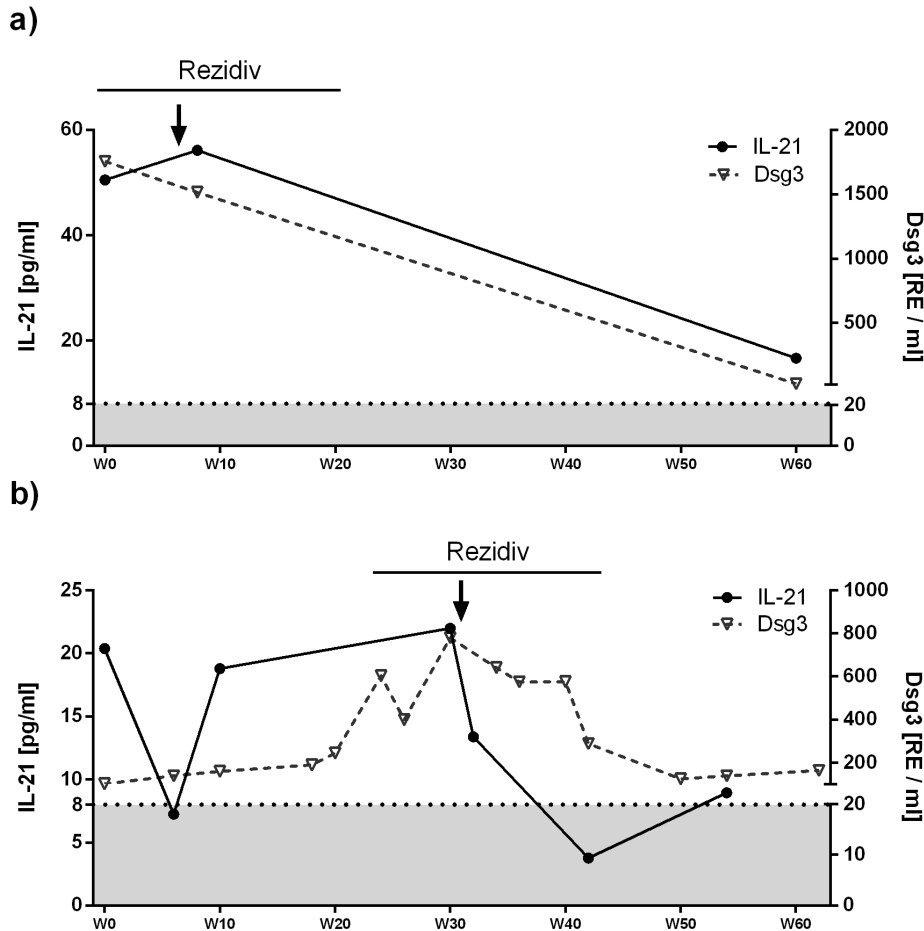


Abb. 4.4: Verlauf von Interleukin (IL)-21 und Desmoglein (Dsg)3-spezifischen Autoantikörpern im Plasma von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten unter immunsuppressiver Therapie. Dargestellt sind die zeitlichen Veränderung von IL-21 und anti-Dsg3 IgG im Blut von zwei PV-Patienten ((a) PV17 (b) PV2). Der Zeitpunkt eines klinischen Rezidivs und die Einleitung einer zusätzlichen immunsuppressiven Therapie (Pfeil) sind gekennzeichnet. Die angegebenen Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Der Grenzwert für die IL-21-Bestimmung (8 pg/ml) und Autoantikörperbestimmung (20 relative Einheiten (RE)/ml) ist grau dargestellt.

4.2.3 IL-21 Produktion von stimulierten CD4⁺ T-Zellen bei PV-Patienten

Da IL-21 zwar vorrangig von CD4⁺ T-Zellen produziert wird (Spolski und Leonard, 2014), die Produktion aber auch für weitere Immunzellen beschrieben wurde, war es notwendig Aufschluss über den zellulären Ursprung von IL-21 bei PV-Patienten zu erhalten. Hierfür wurden IL-21-produzierende (IL-21⁺) CD4⁺ T-Zellen nach *in vitro* Stimulation (Abschnitt 3.7) untersucht. Zusätzlich wurde die Produktion der Zytokine IL-4 und IL-17 bestimmt. Diese dienten als Markerzytokine für weitere T-Zell-Subpopulationen. Dabei wurde die Produktion von IL-4 den mit der humoralen Immunantwort assoziierten Th2-Zellen zugeordnet. IL-17-produzierende Zellen repräsentieren Th17-Zellen, die ebenfalls als IL-21 Produzenten beschrieben worden sind. IL-21 wurde vor allem von CD4⁺ T-Zellen produziert, während bei CD4⁺ Lymphozyten geringere Mengen von IL-21-produzierenden Zellen beobachtet werden konnten (Abb.4.5), welches die bereits beschriebene Dominanz von CD4⁺ T-Zellen bei der Produktion von IL-21 bestätigt.

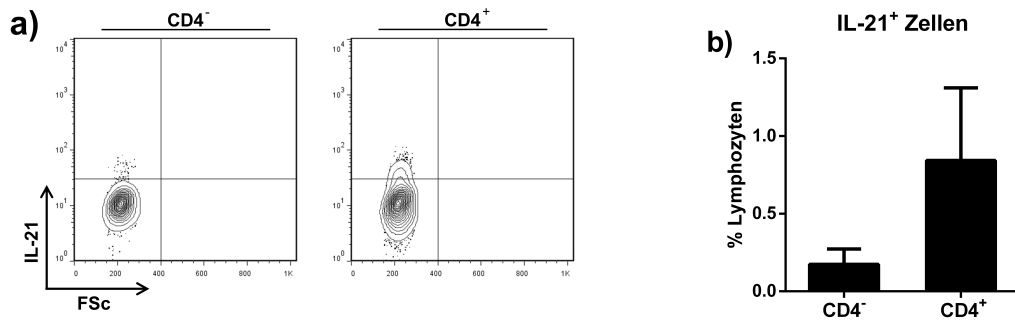


Abb. 4.5: Produktion von Interleukin (IL)-21 bei CD4⁺ T-Helfer-Zellen. (a) Darstellung der IL-21 Produktion in CD4⁺ Zellen und CD4⁻ Zellen eines repräsentativen PV-Patienten (PV15). (b) Anteil von IL-21-produzierenden CD4⁻ und CD4⁺ Zellen innerhalb der untersuchten Lymphozytenpopulation bei PV-Patienten (n=14). FSc, forward scatter.

Innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs konnten bei PV-Patienten mit aktiven Krankheitsstatus vermehrt IL-21⁺ T-Zellen beobachtet werden (Median: 3,01 % aller CD4⁺ T-Zellen; Abb.4.6a). Auffällig war hierbei ein merklicher Unterschied zu den remittierenden Patienten (Median: 1,15 % CD4⁺ T-Zellen). Die Zahl der IL-21⁺ T-Zellen war hier um fast das 3-fache erhöht. Ein einzelner remittierender Patient (PV13) besaß ebenfalls eine sehr hohe Zahl (5,36 % aller CD4⁺ T-Zellen) an IL-21⁺ T-Zellen. Die Kontrollen zeigten im Vergleich hierzu ein heterogeneres Bild mit teils geringen IL-21⁺ T-Zellen, ähnlich den PV-Patienten in Remission, und zugleich sehr hohe IL-21⁺ T-Zellen, ähnlich den aktiven PV-Patienten, wobei insgesamt ein statistischer Unterschied zwischen Kontrollen und aktiven PV-Patienten festgestellt werden konnte. IL-4⁺ T-Zellen waren hingegen bei PV-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen unverändert (Abb.4.6b), und lagen bei einem Großteil der aktiven Patienten tendenziell verringert vor. Die Kontrollen zeigten wie zuvor bei den IL-21⁺ T-Zellen ebenfalls ein individuell unterschiedliches Vorkommen von IL-4-produzierenden T-Zellen. IL-17⁺ T-Zellen konnten in teils stärkerer Ausprägung sowohl bei aktiven als auch remittierenden Patienten beobachtet werden (Abb.4.6c), wobei im Vergleich zu den Kontrollen kein statistischer Unterschied festgestellt wurde.

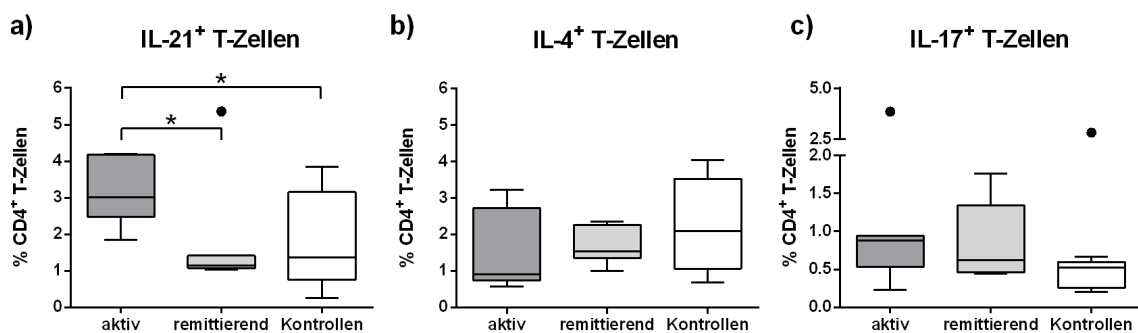


Abb. 4.6: Zytokinproduktion in CD4⁺ T-Zellen in Patienten mit Pemphigus vulgaris (PV) und Kontrollen. Die Produktion der Zytokine Interleukin (IL)-21, IL-17 und IL-4 wurde in CD4⁺ T-Zellen nach *in vitro* Stimulation (Abschnitt 22) bei PV-Patienten (unterteilt in aktiv (n=7) und remittierend (n=7)) und Kontrollen (n=12) bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. * $p < 0,05$.

4.2.4 Zytokinsekretion von IL-21-produzierenden T-Zellen

Zur Klärung der Frage, welche weiteren Zytokine von IL-21⁺ T-Zellen produziert werden, wurden diese hinsichtlich der in Abschnitt 4.2.3 genannten Markerzytokine IL-4 (Th2-Zellen) und IL-17 (Th17-Zellen) untersucht. Zusätzlich wurden bei einem Teil des Patientenkollektivs (n=5) IL-10-produzierende T-Zellen bestimmt, welche potentielle Tr1/Treg-Zellen darstellen. Der Großteil der IL-21⁺ T-Zellen produzierte hierbei ausschließlich IL-21 (Abb.4.7). Daneben konnten in geringeren Anteilen IL-4⁺ und IL-17⁺ Zellen beobachtet werden, während IL-10⁺ Zellen nur vereinzelt vorkamen. Die gesunden Kontrollen zeigten diesbezüglich eine ähnliche Verteilung (Daten nicht dargestellt).

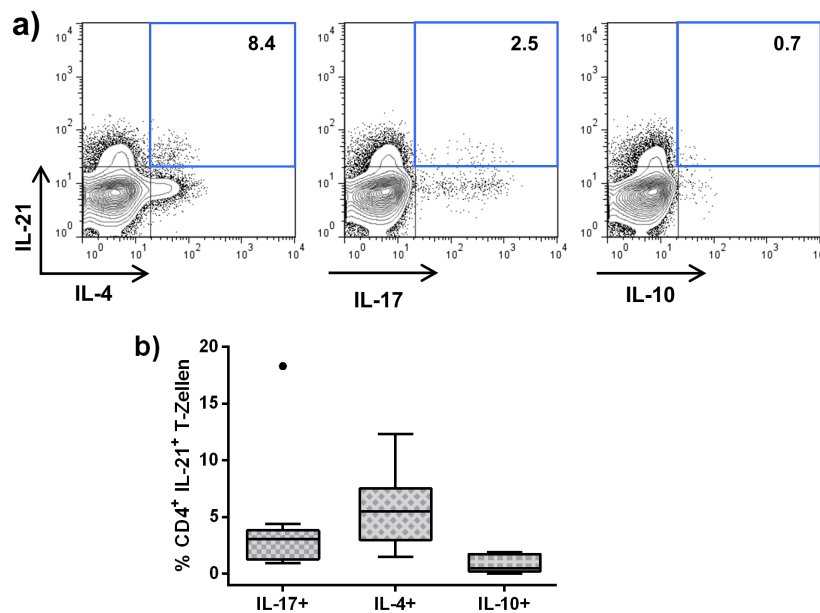


Abb. 4.7: Zytokinsignatur von Interleukin (IL)-21-produzierenden T-Zellen. (a) IL-4-, IL-17- und IL-10- Produktion von IL-21⁺ CD4⁺ T-Zellen (blauer Kasten) eines repräsentativen PV-Patienten (PV21). (b) Anteil der Produktion von IL-4 (n=14), IL-17 (n=14) und IL-10 (n=5) bei IL-21-produzierenden T-Zellen von PV-Patienten.

4.2.5 Bestimmung der IL-21 Produktion von Dsg3-spezifischen T-Zellen

In den bisherigen Untersuchungen konnte unabhängig von der jeweiligen Antigen-spezifität ein erhöhtes Vorkommen von IL-21-produzierenden T-Zellen bei Patienten mit PV beobachtet werden, welches eine spezifische Beteiligung von autoreaktiven T-Zellen bei der IL-21-Produktion beim PV vermuten lässt. Zur weiteren Klärung wurde daher die Anzahl an antigenspezifischen T-Zellen, die nach Stimulation mit rekombinanten Dsg3-Protein IL-21 produzierten, mittels ELISPOT-Verfahrens (Abschnitt 3.7) bestimmt. Um zusätzlich eine unspezifische Immunstimulation durch etwaige im Dsg3-Protein enthaltenen fremde Proteinbestandteile aus dem verwendeten Expressionssystem bestimmen zu können, wurde rekombinantes Kollagen7, das wie Dsg3 in Arthropodenzellen (Abschnitt 2.2) exprimiert wurde, verwendet. Da PV-Patienten keine Auto-reaktivität gegen Kollagen7 aufweisen, konnte die für das Kontrollprotein beobachtete IL-21-Produktion als unspezifisch definiert werden. In Abbildung 4.8 ist das Ergebnis der ELISpot-Analyse dargestellt.

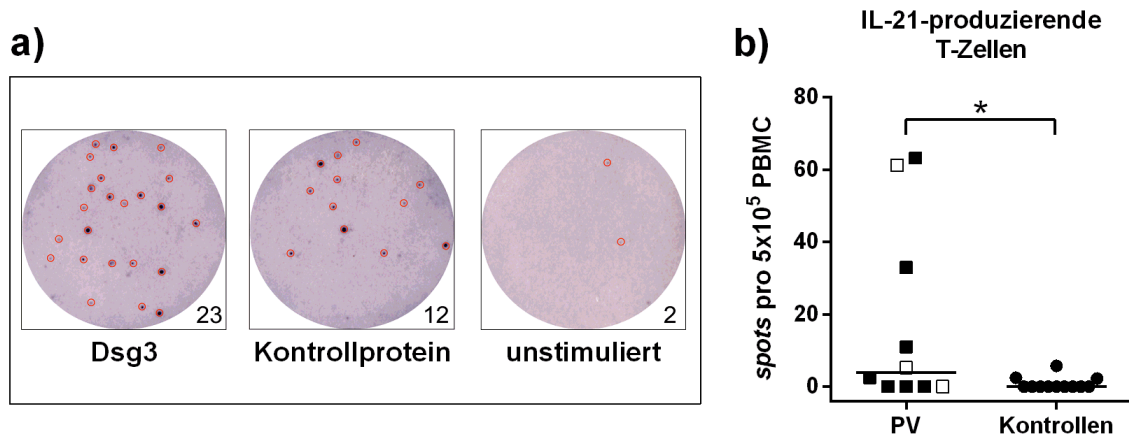


Abb. 4.8: Interleukin (IL)-21-Produktion von Desmoglein (Dsg)3-spezifischen T-Zellen. Die Anzahl von Dsg3-spezifischen T-Zellen, die nach Antigenstimulation IL-21 produzierten, wurde mittels ELISpot-Verfahren bestimmt. Dabei wurden PBMC von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten und Kontrollen mit Dsg3 sowie Kollagen7 (Kontrollprotein) zunächst stimuliert und die Zellen anschließend für die Detektion einzelner IL-21-produzierender T-Zellen auf eine ELISpot-Membran aufgetragen (Abschnitt 3.7). **(a)** Repräsentative Membran eines PV-Patienten (PV2) mit Dsg3- und Kontrollprotein-stimulierten sowie unstimulierten PBMC mit gezählten Spotzahlen (unten rechts). IL-21-produzierende Zellen sind als einzelne spots (roter Kreis) sichtbar. **(b)** Anzahl IL-21-produzierender Dsg3-spezifischer T-Zellen bei PV-Patienten (n=10) und Kontrollen (n=12). Schwarzer Kasten, aktiv; weißer Kasten, remittierend. Zur Berechnung wurden die unspezifischen spots des Kontrollproteins von den Dsg3-stimulierten Proben subtrahiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test ermittelt. * $p < 0,05$.

Dsg3-spezifische IL-21-produzierende T-Zellen konnten in geringer Frequenz (Max.: 63; Min.: 3 Zellen pro 5×10^5 PBMC) bei 6 der 10 untersuchten PV-Patienten (sowohl aktiv und remittierend) beobachtet werden. Eine genauere Beurteilung der IL-21 Produktion von Dsg3-spezifischen T-Zellen in Abhängigkeit vom Krankheitsstatus konnte aufgrund der geringen Fallzahl nur bedingt getroffen werden. Bei den Kontrollen waren bei drei Individuen gering erhöhte Frequenzen (2, 2 und 5 pro 5×10^5 PBMC) von IL-21-produzierenden T-Zellen messbar.

4.2.6 Untersuchung von zirkulierenden Tfh-Zellen bei PV-Patienten und Kontrollen

Neben den zuvor beschriebenen Untersuchungen an IL-21-produzierenden T-Zellen wurde die Frequenz von Tfh-Zellen im peripheren Blut der PV-Patienten bestimmt. Die Detektion dieser 'zirkulierenden' Tfh-Zellen erfolgte hierbei als $CD4^+CXCR5^+$ T-Zellen, die als eine im peripheren Blut vorkommende Population von Gedächtnis Tfh-Zellen angesehen werden (Ryu et al., 2015; Morita et al., 2011; Spolski und Leonard, 2008). Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der Zellpopulation wurde zusätzlich die Expression der kostimulierenden Moleküle PD-1 und ICOS auf den Tfh-Zellen untersucht (Abb.4.9).

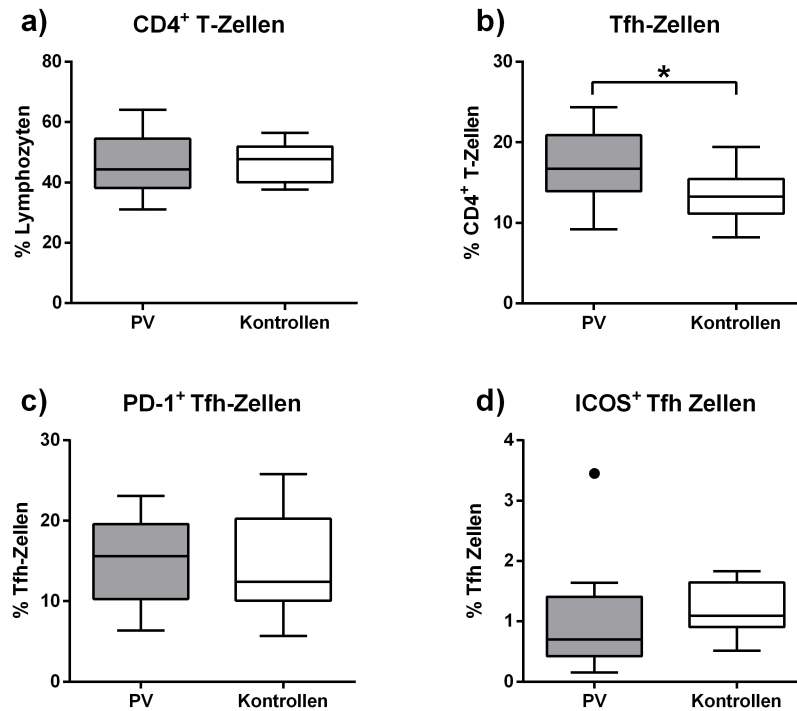


Abb. 4.9: Anteil von follikulären T-Helfer (Tfh)-Zellen im peripheren Blut von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten und Kontrollen. (a) Verteilung der gesamten CD4⁺ T-Zellen sowie **(b)** Frequenz von CD4⁺CXCR5⁺ Tfh-Zellen. **(c-d)** Expression der kostimulatorischen Moleküle *programmed cell death protein-1* (PD-1) und *inducible T-cell costimulator* (ICOS) bei Tfh-Zellen bei PV-Patienten (n=12) und Kontrollen (n=12). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. * $p < 0,05$

Es konnte eine erhöhte Zahl von CD4⁺CXCR5⁺ T-Zellen (Median: 16,7 % CD4⁺ T-Zellen) bei PV-Patienten innerhalb der CD4⁺ T-Zell-Population beobachtet werden (Abb.4.9b), die unabhängig vom Krankheitsstatus und von der Autoantikörperkonzentration der PV-Patienten auftrat. Die Verteilung aller CD4⁺ T-Zellen blieb dabei bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen unverändert. Tfh-Zellen von PV-Patienten exprimierten zu unterschiedlichen Teilen die kostimulatorischen Moleküle PD-1 (Median: 16,1 % Tfh-Zellen) und ICOS (Median: 0,587 % Tfh-Zellen), wobei kein statistischer Unterschied zwischen PV-Patienten und den Kontrollen festgestellt werden konnte.

4.3 Entwicklung und Evaluation eines durchflusszytometrischen Testverfahrens zur Detektion von Dsg3-spezifischen B-Zellen

Neben der Untersuchung von Tfh-Zellen und IL-21 bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der Untersuchung von autoreaktiven B-Zellen bei PV-Patienten. Zu diesem Zweck musste zunächst ein sensitives durchflusszytometrisches Testsystem zur Detektion von niedrig-frequenten Dsg3-spezifischen B-Zellen etabliert werden. Hierzu wurde rekombinantes Dsg3 mit dem Fluorochrom Alexa Fluor (AF) 647 durch Konjugation mit den primären Aminen des Dsg3-Proteins markiert und das so erstellte Dsg3-AF647 anschließend aufgereinigt (Abschnitt 3.5). Die Färbung von B-Zellen mit Dsg3-AF647 sollte im Anschluss die durchflusszytometrische Detektion von autoreaktiven B-Zellen, über Bindung des fluoreszierenden Dsg3-AF647 an den antigen-spezifischen B-Zell-Rezeptor, ermöglichen (Abb.4.10).

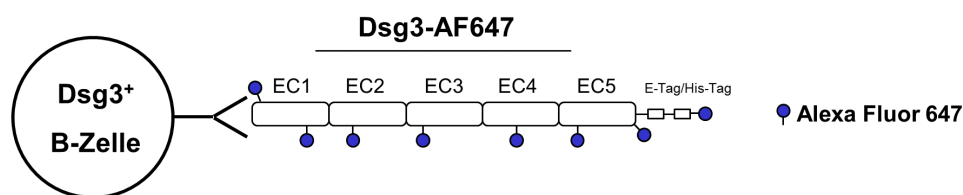


Abb. 4.10: Strategie zur Detektion von Desmoglein (Dsg)3-spezifischen B-Zellen mittels fluoreszenzmarkierten Autoantigenen. Rekombinantes Dsg3, bestehend aus den extrazellulären Domänen (EC1-EC5) wurde durch Konjugation mit dem Fluorochrom Alexa Fluor (AF) 647 (blaue Punkte) fluoreszenzmarkiert. Durch die Bindung des Dsg3-AF647-Proteins an den B-Zell-Rezeptor einer Dsg3-spezifischen (Dsg3⁺) B-Zelle kann diese mittels Durchflusszytometrie detektiert werden.

Zur Etablierung des Testsystems wurden zunächst murine monoklonale Dsg3-spezifische B-Zell-Klone als geeignete Positiv- und Negativkontrollen generiert (Abschnitt 4.3.1). Im Anschluss daran wurde das Testsystem hinsichtlich seiner Sensitivität und Spezifität evaluiert (Abschnitt 4.3.2).

4.3.1 Generierung von murinen B-Zell-Klonen als Positiv- und Negativkontrolle

Um die Verwendung von Dsg3-AF647 zur durchflusszytometrischen Detektion von Dsg3-spezifischen B-Zellen zu evaluieren, war es notwendig die Färbung zunächst mit Zellen mit bekannter Dsg3-Spezifität durchzuführen. Hierfür sollten murine B-Zell-Hybridome verwendet werden, die nach Dsg3-Immunisierung von Mäusen durch Fusionierung der Splenozyten mit Myelomzellen erzeugt wurden. Aus vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe lagen bereits zwei polyklonale Dsg3-spezifische Hybridomzelllinien (1H9 und 4B3) vor, aus denen monoklonale B-Zell-Klone gewonnen werden konnten. Hierfür wurden diese zunächst hinsichtlich ihres Antikörperprofils untersucht. Anschließend wurden die Zellen subkloniert, um monoklonale B-Zell-Klone zu erhalten, die spezifisch oder nicht-spezifisch für Dsg3 waren.

Antikörperprofil der Hybridomzelllinien 1H9 und 4B3

Die Spezifität für Dsg3 und die extrazellulären Subdomänen wurde für die Hybridomzelllinien 1H9 und 4B3 mittels ELISA (Abschnitt 3.10) bestimmt. Dabei konnte eine jeweils unterschiedliche Spezifität für die extrazellulären Dsg3-Subdomänen festgestellt werden (Abb.4.11). Die von 1H9 sezernierten Antikörper zeigten ausschließlich Spezifität für die extrazelluläre Domäne 5 (EC5) des Dsg3-Proteins. Demgegenüber konnten für die Linie 4B3 schwache Spezifitäten für alle extrazellulären Dsg3-Subdomänen beobachtet werden.

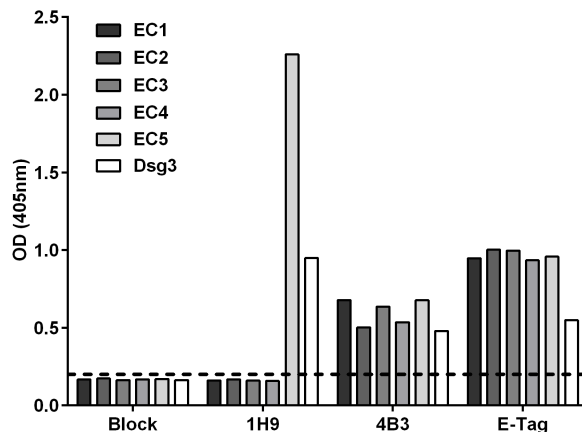


Abb. 4.11: Spezifität von Hybridomzelllinien gegenüber Desmoglein (Dsg)3 und Dsg3-Subdomänen. Die von den Hybridomzelllinien 1H9 und 4B3 sezernierten Antikörper wurden mittels Dsg3-IgG-ELISA auf ihre Spezifität für Dsg3 und einzelne extrazelluläre Dsg3-Domänen (EC1-EC5) überprüft. Als Negativkontrolle dienten Ansätze, denen Block-Puffer (gestrichelte Linie) hinzugegeben wurde. Ein Antikörper gegen den E-Tag des rekombinanten Dsg3-Proteins diente als Positivkontrolle. Beide Hybridomzelllinien sind spezifisch für Dsg3, wobei die Reaktivität gegenüber den EC-Domänen variiert. EC, extrazelluläre Domäne; OD, optische Dichte.

Subklonierung der Hybridomzelllinien 1H9 und 4B3

Um einzelne monoklonale Dsg3-spezifische B-Zell-Klone zu erhalten, wurden die Zellen der Linien 1H9 und 4B3 durch Grenzwert-Verdünnung subkloniert (Abschnitt 3.9) und die Spezifität der Klone mittels ELISA bestimmt. Die Klone, die Spezifität für Dsg3 zeigten, sollten anschließend als Positivkontrolle für die Färbung mit Dsg3-AF647 verwendet werden, wohingegen unspezifische Klone als Negativkontrolle zum Einsatz kommen sollten. Unter den zehn nach Subklonierung der Linie 1H9 getesteten B-Zell-Klonen konnten zwei Dsg3-spezifische Klone (2B2 und 2C10) ermittelt werden (Abb.4.12), die beide erwartungsgemäß die gleiche ausschließliche Spezifität für die extrazelluläre Domäne 5 des Dsg3-Proteins wie die Ursprungslinie aufwiesen. Hierbei wurde beim Klon 2C10 eine im Vergleich zum Klon 2B2 höhere Antikörpermenge gemessen, was auf eine stärkere Antikörpersekretion von 2C10 hindeutete. Nach Subklonierung der Linie 4B3 konnten keine Dsg3-spezifischen Klone erhalten werden (Abb.4.12; Ergebnis für vier exemplarischen Klone: 7E4, 6D2, 3A4, 1F12 dargestellt), wobei die Antigenspezifität dieser Klone nicht weiter ermittelt werden konnte.

Abschließend konnten basierend auf den Ergebnissen der Subklonierung der Dsg3-spezifische

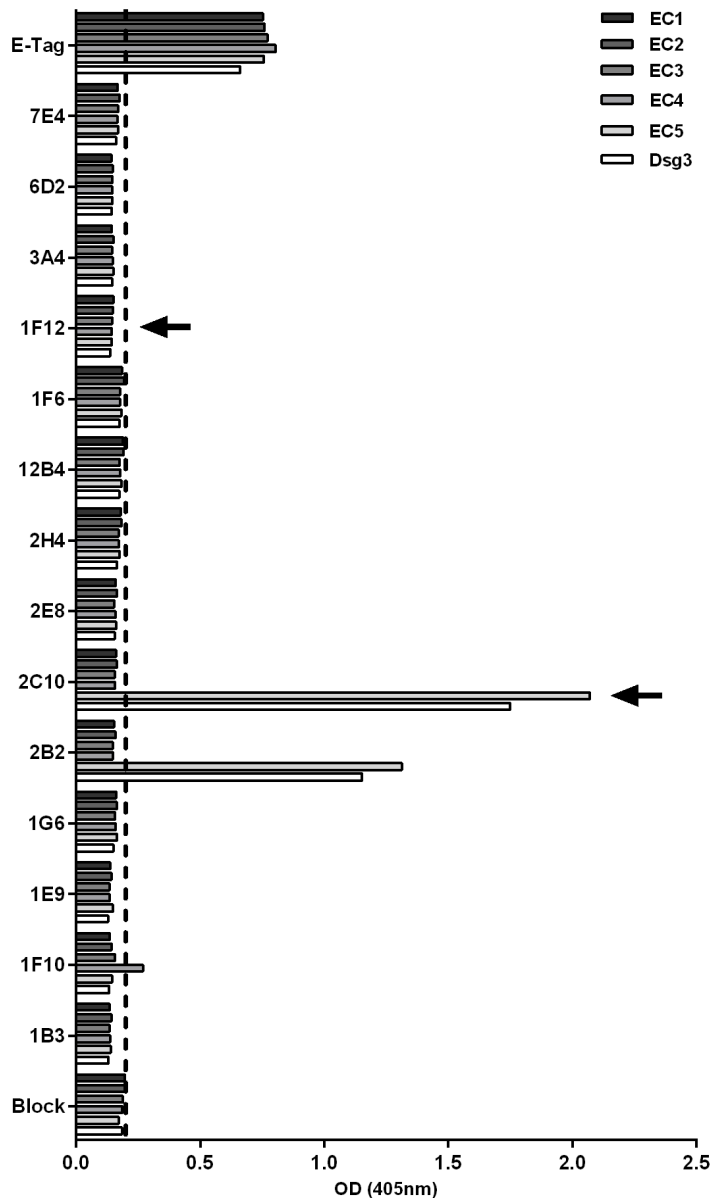


Abb. 4.12: Bestimmung der Spezifität von B-Zell-Klonen für Desmoglein (Dsg) 3 und Dsg3-Subdomänen nach Subklonierung. Dargestellt sind die Ergebnisse des Dsg3-IgG ELISA mit Überständen der nach Subklonierungen der B-Zell-Hybridomlinien 1H9 und 4B3 erhaltenen B-Zell-Klone. Als Negativkontrolle dienten Ansätze, denen Block-Puffer (gestrichelte Linie) hinzugegeben wurde. Ein Antikörper gegen den E-Tag des rekombinanten Dsg3-Proteins wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Klone 2C10 (Dsg3-spezifisch) und 1F12 (nicht Dsg3-spezifisch) wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet. OD, optische Dichte.

Klon 2C10 und der unspezifische Klon 1F12 identifiziert werden, die in den nachfolgenden Untersuchungen als Positivkontrolle und Negativkontrolle verwendet wurden.

4.3.2 Bestimmung der Sensitivität und Spezifität des Testsystems

Zur Evaluation der Detektion von Dsg3-spezifischen B-Zellen mittels Dsg3-AF647 wurden die generierten monoklonalen B-Zell-Klone 2C10 und 1F12 eingesetzt. Dabei wurden die Zellen mit Dsg3-AF647 gefärbt und die Bindung des Proteins an die Zellen durchflusszytometrisch be-

stimmt. Bei beiden Klonen konnte das Vorhandensein eines B-Zell-Rezeptors über Färbung von membrangebundenen IgG bestätigt werden. Es wurde ein starkes Fluoreszenzsignal für Dsg3-AF647 bei nahezu allen Zellen des Klons 2C10 (Dsg3-spezifische Positivkontrolle) festgestellt, wohingegen beim Klon 1F12 (nicht Dsg3-spezifische Negativkontrolle) lediglich vereinzelt positive Zellen beobachtet werden konnten (Abb.4.13). Die Stärke des Fluoreszenzsignals unter Verwendung von Klon 2C10 korrelierte ebenfalls mit der Stärke der IgG-Färbung, welches eine spezifische Bindung von Dsg3-AF647 an den B-Zell-Rezeptor vermuten lässt. Das Absättigen des B-Zell-Rezeptors durch Vorinkubation mit nicht fluoreszenzmarkierten Dsg3 (40-fache Menge) führte zu einem starken Abfalls des Fluoreszenzsignals, welches die Spezifität der Färbung von Dsg3-AF647 an B-Zell-Rezeptoren zusätzlich bekräftigt.

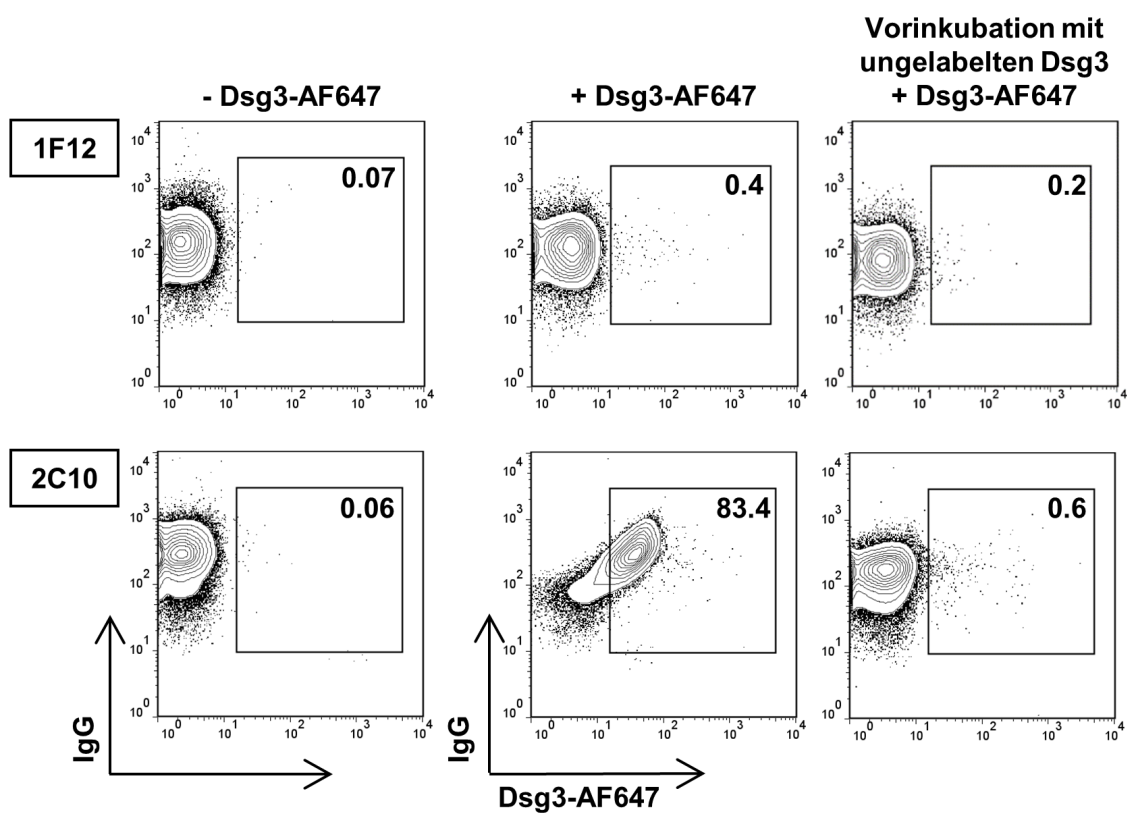


Abb. 4.13: Detektion von Desmoglein (Dsg)3-spezifischen B-Zell-Klonen mit fluoreszenzmarkierten Autoantigenen. Die Dsg3-Spezifität der murinen B-Zell-Klone 2C10 (Dsg3-spezifisch) und 1F12 (nicht Dsg3-spezifisch) wurde unter Einsatz von fluoreszenzmarkierten Dsg3 (Dsg3-AF647) bestimmt. Daneben erfolgte die Detektion des B-Zell-Rezeptors durch IgG-Färbung. In einem weiteren Ansatz erfolgte vor der Färbung mit Dsg3-AF647 eine Vorinkubation mit nicht fluoreszenzmarkierten Dsg3-Protein (40-fache Menge; 30 Minuten) AF647, Alexa Fluor 647; IgG, Immunglobulin G.

Das Vorhandensein des B-Zell-Rezeptors konnte für beide Klone über Detektion von IgG auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Daneben wurde überprüft, ob geringe Frequenzen von Dsg3-spezifischen B-Zellen, wie sie bei PV-Patienten zu erwarten waren, ebenfalls detektiert werden können. Hierzu wurden die Zellen des Dsg3-spezifischen Klons 2C10 verdünnt und in verschiedenen Verhältnissen (1:16; 1:32; 1:64; 1:128) mit Zellen des Klons 1F12 (Negativkontrolle) gemischt (Abb.4.14). Dabei konnte eine abgegrenzte Population von Dsg3-spezifischen

B-Zellen beobachtet werden, deren Anteil mit steigender Verdünnung von 2C10 abnahm und auch bei geringen Frequenzen (0,7 % aller Zellen) noch detektiert werden konnte.

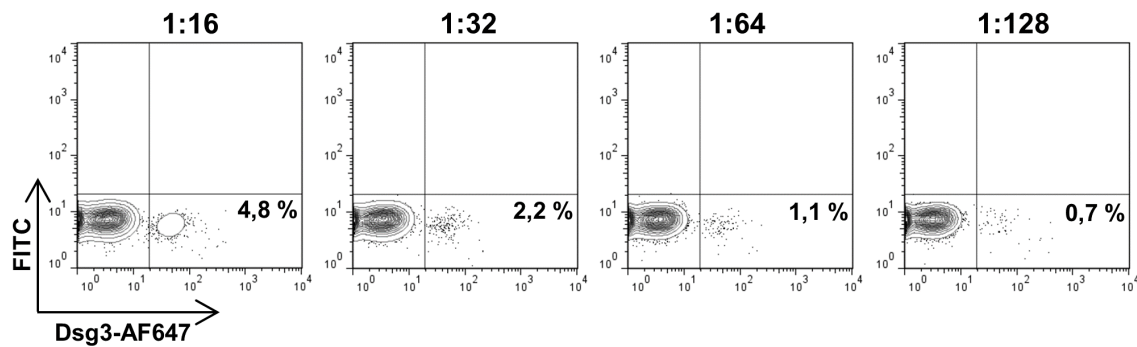


Abb. 4.14: Titration von Desmoglein (Dsg3)-spezifischen B-Zell-Klonen. Der murine B-Zell-Klon 2C10 (Dsg3-spezifisch) wurde in unterschiedlichen Verhältnissen (1:16 - 1:128) mit dem B-Zell-Klon 1F12 (nicht Dsg3-spezifisch) gemischt. Angegeben ist der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil von Dsg3-spezifischen B-Zellen nach Färbung mit Dsg3-AF647 in Prozent von allen analysierten Zellen.

Zusammenfassend konnte unter Einsatz von Dsg3-AF647 durch die in diesem Teil der Arbeit erfolgten Untersuchungen mit Dsg3-spezifischen und unspezifischen B-Zell-Klonen ein sensitives Testsystem zur spezifischen Detektion von autoreaktiven B-Zellen etabliert werden, welches in den nachfolgenden Untersuchungen bei PV-Patienten verwendet wurde.

4.4 Untersuchung von Dsg3-spezifischen B-Zellen bei Patienten mit PV

Mit dem im vorherigen Abschnitt etablierten Testsystem wurden Dsg3-spezifische B-Zellen in 14 PV-Patienten und 14 Kontrollen untersucht. Das Patientenkollektiv umfasste 4 Patienten mit aktiver Erkrankung sowie 10 remittierende Patienten. Die Untersuchung von autoreaktiven B-Zellen innerhalb eines Kollektivs von PV-Patienten mit unterschiedlichem Krankheitszustand und Therapien sollte weiteren Aufschluss über die Verteilung von autoreaktiven B-Zellen im Verlauf einer Pemphiguserkrankung geben. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurden die drei CD19⁺ Subpopulationen unreife, naive B-Zellen (CD27⁻), Gedächtnis B-Zellen (CD27⁺) sowie Plasmablasten (CD27⁺⁺CD38⁺⁺) anhand der Oberflächenexpression von CD27 und CD38 unterschieden (Abb.4.15).

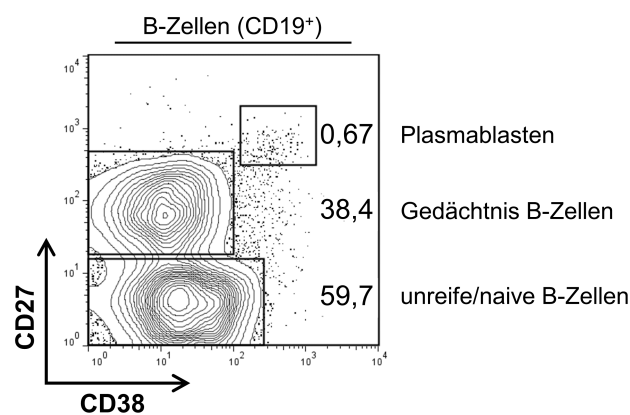


Abb. 4.15: Definition von B-Zell-Subpopulationen anhand der Oberflächenexpression von CD27 und CD38.

Darstellung der untersuchten B-Zell-Subpopulationen eines repräsentativen PV-Patienten (PV18). Angegeben ist der Anteil von CD27⁻ naive B-Zellen, CD27⁺ Gedächtnis B-Zellen und CD27⁺⁺CD38⁺⁺ Plasmablasten an allen CD19⁺ B-Zellen in Prozent.

Es wurde zunächst die gesamte Verteilung von B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen in PV-Patienten untersucht und mit den Kontrollen verglichen. (Abb.4.16). Beim Vergleich der B-Zell-Populationen zwischen den PV-Patienten und Kontrollen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Allerdings waren B-Zellen bei den PV-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen tendenziell verringert (Median: 6,24 % und 9,31 %). Die B-Zellen der Patienten bestanden zum größten Teil aus naiven B-Zellen (Median: 63,73 %) und Gedächtnis B-Zellen (Median: 29,95 %) sowie zu kleinen Anteilen aus Plasmablasten, wobei die Kontrollen bezüglich der B-Zell-Populationen eine vergleichbare Verteilung aufzeigten. Auffällig war hierbei eine deutlich höhere individuelle Streuung bei den PV-Patienten, welche sich in einer sehr hohen oder niedrigen Anzahl von B-Zellen (Max.: 18,80 % ; Min.: 0,75 %) und sehr hohen Anteilen von naiven B-Zellen (Max.: 97,46 % aller B-Zellen) äußerte. Diese Beobachtung war hauptsächlich auf eine in der Vergangenheit durchgeführte B-Zell-Depletion mit dem anti-CD20-Antikörper Rituximab bei einem Teil des Patientenkollektivs (5 von 14; PV3;12;17;19,23) zurückzuführen, welche sich in einer starken Reduktion von Gedächtnis B-Zellen bei gleichzeitiger Zunahme von naiven B-Zellen im peripheren Blut äußerte.

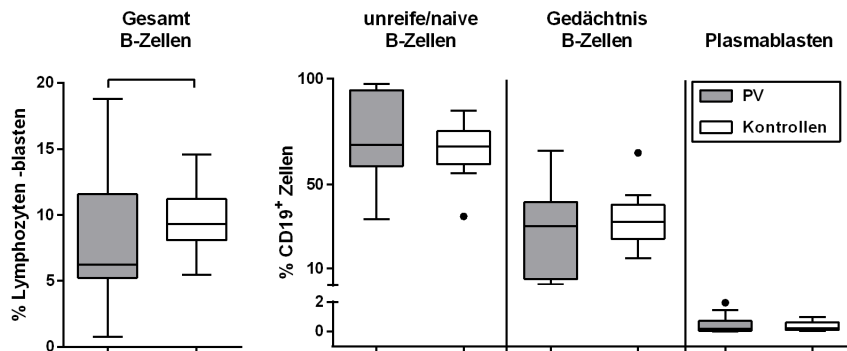


Abb. 4.16: B-Zell-Verteilung bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten und Kontrollen. Übersicht über die Verteilung von B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen (unreif/naiv, Gedächtnis und Plasmablasten) innerhalb der Gruppe der PV-Patienten (n=14) und den Kontrollen (n=14). Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Jedoch zeigte sich bei den PV-Patienten eine höhere individuelle Streuung innerhalb der jeweiligen Zellpopulationen.

4.4.1 Analyse von Dsg3-spezifischen B-Zellen bei PV-Patienten und Kontrollen

Die Frequenz von autoreaktiven B-Zellen im Patientenkollektiv wurde durch Einsatz von Dsg3-AF647 untersucht. Dabei konnten Dsg3-spezifische B-Zellen bei PV-Patienten detektiert werden (Abb.4.17), wobei deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Patienten und innerhalb der B-Zell-Subpopulationen beobachtet werden konnten.

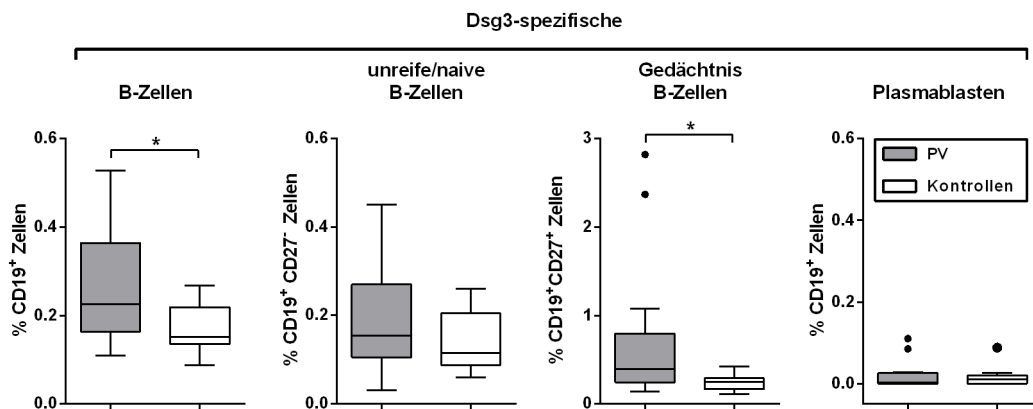


Abb. 4.17: Verteilung von Desmoglein(Dsg)3-spezifischen B-Zellen bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten und Kontrollen. Dargestellt ist die Verteilung von Dsg3-spezifischen B-Zellen innerhalb der Gruppe der PV-Patienten (n=14) und Kontrollen (n=14) in allen B-Zellen (Gesamt) sowie den Subpopulationen unreife/naive B-Zellen, Gedächtnis B-Zellen und Plasmablasten. Dsg3-spezifische B-Zellen waren bei PV-Patienten deutlich erhöht und konnten vor allem in Form von autoreaktiven Gedächtnis B-Zellen beobachtet werden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. * $p < 0,05$.

Innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs konnte ein im Vergleich zu den Kontrollen erhöhtes Vorkommen von Dsg3-spezifischen B-Zellen (Median: 0,23 % aller B-Zellen) beobachtet werden. Hierbei waren autoreaktive B-Zellen vor allem in der Subpopulation der Gedächtnis

B-Zellen zu finden, wobei diese in einzelnen Patienten in teils sehr starker Ausprägung (bis zu 2,8 % Anteil an Gedächtnis B-Zellen) gemessen werden konnten. Innerhalb der naiven B-Zellen waren Dsg3-spezifische B-Zellen bei einzelnen Patienten merklich erhöht. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Autoreaktive Plasmablasten konnten bei den Patienten nur vereinzelt und in sehr geringen Frequenzen (Median: 0 % aller B-Zellen) detektiert werden. Interessanterweise waren Dsg3-spezifische B-Zellen in geringer Frequenz auch bei den Kontrollen zu finden (Median: 0,15 % aller B-Zellen), wobei diese vorrangig aus naiven B-Zellen bestanden.

4.4.2 Korrelation der Dsg3-spezifischer B-Zellen mit anti-Dsg3 Autoantikörpern

Innerhalb der untersuchten PV-Patienten konnten abhängig vom jeweiligen Krankheitsstatus unterschiedlich hohe bzw. keine Dsg3-Autoantikörper im Blut nachgewiesen werden (Abb.4.1, S.30). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem erhöhten Vorkommen von autoreaktiven B-Zellen und dem Vorhandensein von Autoantikörpern im Serum der PV-Patienten zu überprüfen, wurden Dsg3-spezifische B-Zell-Subpopulationen hinsichtlich einer Korrelation mit Dsg3-Autoantikörpern untersucht (Abb.4.18). Dabei konnte keine Korrelationen zwischen naiven und Gedächtnis B-Zellen festgestellt werden. Dsg3⁺ Plasmablasten korrelierten nur sehr schwach mit anti-Dsg3 IgG ($r_s = 0,28$), wobei keine statistische Signifikanz erreichte wurde.

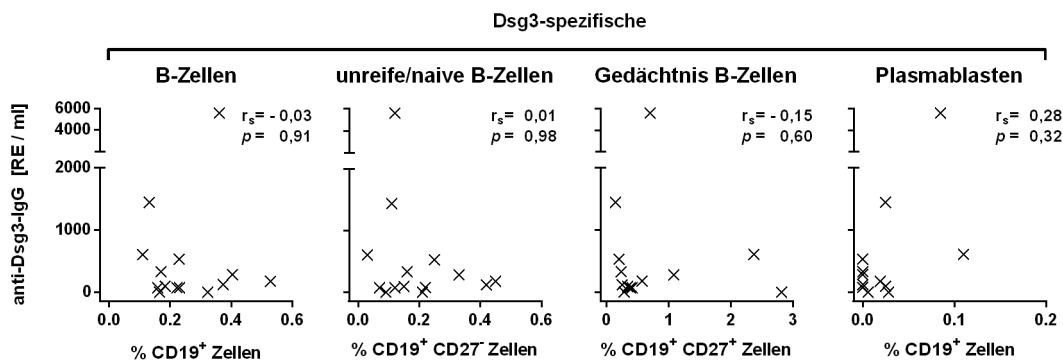


Abb. 4.18: Untersuchung der Korrelation von Dsg3-spezifischen B-Zellen mit Autoantikörpern. Dsg3-spezifische B-Zellen im Blut von PV-Patienten (n=14) wurden hinsichtlich einer Korrelation mit anti-Dsg3 IgG im Serum untersucht. Angegeben sind die Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten (r_s) und statistische Signifikanzen (p -Wert) für die einzelnen B-Zell-Subpopulationen. RE, relative Einheiten.

4.4.3 Einfluss von systemischen Therapien auf Dsg3-spezifische B-Zellen

Um einen möglichen Einfluss der systemischen Therapie bestehend aus Kortikosteroiden und adjuvanten Immunsuppressiva auf Dsg3-spezifischen B-Zellen zu bestimmen, wurde das Kollektiv der Patienten in die zwei Gruppen "keine/niedrige Therapie" (<10mg Prednisolon/Tag; n=6) und "moderate Therapie" (>10mg Prednisolon/Tag; n=8) unterteilt. Es zeigte sich, dass die zuvor beobachtete erhöhte Anzahl von Dsg3-spezifischen B-Zellen vor allem bei Patienten mit minimaler oder keiner Therapie beobachtet werden konnte (Abb.4.19). Dagegen zeigten Patienten mit moderater Therapie eine sehr niedrige Anzahl von Dsg3-spezifischen B-Zellen,

vergleichbar mit der Anzahl, die auch bei den gesunden Kontrollen detektiert werden konnte. Bei unreifen/naiven B-Zellen und Plasmablasten konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

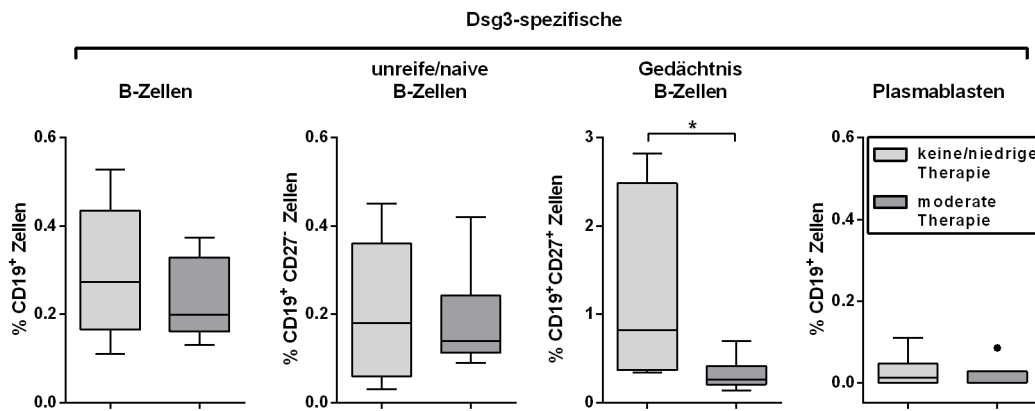


Abb. 4.19: Einfluss von systemischen Therapien auf Dsg3-spezifische B-Zellen. Dargestellt ist die Verteilung von Dsg3-spezifischen B-Zellen bei PV-Patienten unterteilt nach keiner oder niedriger Therapie (n=6) und moderater Therapie (n=8) in allen B-Zellen sowie innerhalb der Subpopulationen naiven/unreifen B-Zellen, Gedächtnis B-Zellen und Plasmablasten. Dsg3-spezifische Gedächtnis B-Zellen konnten vor allem in der Gruppe mit keiner/niedriger Therapie beobachtet werden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. * $p < 0,05$.

Bei der näheren Betrachtung der in der Untersuchung enthaltenen Patienten war zudem auffällig, dass die höchste Anzahl von Dsg3-spezifischen Gedächtnis B-Zellen bei 3 remittierenden Patienten (PV12, PV19, PV23) beobachtet werden konnten, welche innerhalb der letzten 22-27 Monate eine Behandlung mit Rituximab erhielten (Abb.4.20). Im Gegensatz dazu zeigte ein Patient (PV17) nach 9 Monaten keine erhöhte Zahlen von autoreaktiven Gedächtnis B-Zellen. Ebenso wie bei einem Patient (PV3), bei dem es 35 Monate nach der Behandlung zu einer aktiven Exazerbation des PV kam.

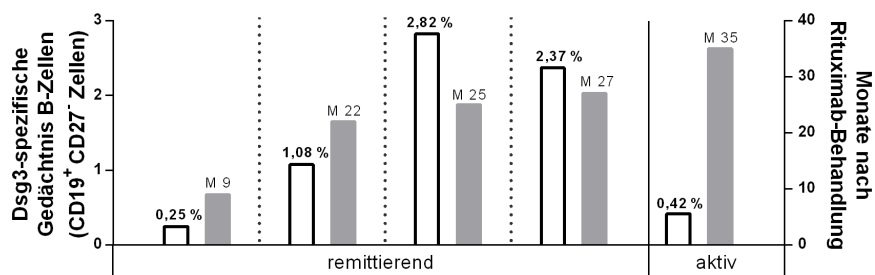


Abb. 4.20: Dsg3-spezifische Gedächtnis B-Zellen bei PV-Patienten unter Rituximabtherapie. Dargestellt sind die Frequenzen von Dsg3-spezifischen Gedächtnis B-Zellen innerhalb des Kollektivs der untersuchten PV-Patienten (linke Y-Achse) bei denen zuvor eine B-Zell-Depletion mittels anti-CD20 Antikörper Rituximab durchgeführt wurde (n=5). Der jeweilige Krankheitszustand (remittierend oder aktive klinische Exazerbation) sowie die Anzahl der Monate nach der Rituximabbehandlung sind angegeben (rechte Y-Achse). Erhöhte Anzahlen von Dsg3-spezifischen Gedächtnis B-Zellen konnten vor allem bei den remittierenden PV-Patienten 22 bis 27 Monate nach der B-Zell-Depletion beobachtet werden. M, Monate.

5. Diskussion

5.1 Betrachtung der humoralen und zellulären Mechanismen im Kontext der adaptiven Autoimmunantwort des PV

Der Pemphigus ist eine Autoimmunerkrankung der Haut bei der es aufgrund einer gestörten Immuntoleranz gegenüber epidermalen Autoantigenen, vorrangig Dsg1 und Dsg3, zur Entstehung von autoreaktiven T-Zellen kommt, welche in der Folge über die Interaktion mit autoreaktiven B-Zellen die Produktion von pathogenen Autoantikörpern initiieren (Pollmann et al., 2018; Kasperkiewicz et al., 2017; Bystryń und Rudolph, 2005). Ziel dieser Arbeit war es, die hierbei beteiligten humoralen und zellulären Mechanismen mit Hinblick auf relevante Zytokine und einzelne T- und B-Zell-Subpopulationen näher zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ein gesteigertes Vorkommen des Zytokins IL-21 im Blutplasma (Abb.4.2, S.32) und eine erhöhte Anzahl von IL-21-produzierende T-Zellen im peripheren Blut von Patienten (Abb.4.6, S.35). Durch die nähere *in vitro* Untersuchung von autoreaktiven T-Zellen von PV-Patienten nach Stimulation mit Dsg3 konnte zusätzlich die antigenspezifische Produktion von IL-21 nachgewiesen werden (Abb.4.8, S.37). Zirkulierende Tfh-Zellen, welche IL-21 produzieren und hierdurch aktiviert werden können, sind ebenfalls im erhöhten Maß im Vergleich zu gesunden Kontrollen im peripheren Blut bei PV-Patienten zu finden (Abb.4.9, S.38). Zusammenfassend legen diese Ergebnisse eine Beteiligung von IL-21-produzierenden T-Zell-Subpopulationen (Tfh, Th2 und Th17-Zellen) bei der Entstehung und Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen beim Pemphigus und deren Differenzierung in Autoantikörper-produzierenden Plasmazellen nahe (Abb.5.1).

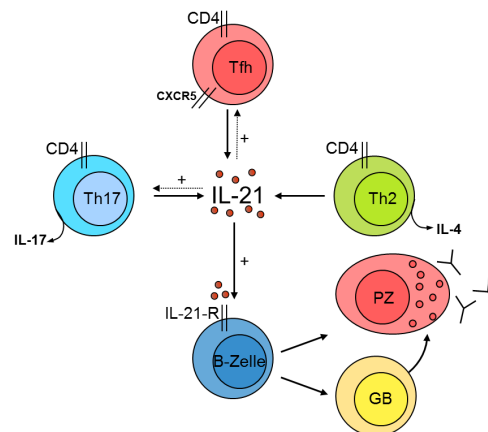


Abb. 5.1: Möglicher Einfluss von IL-21-produzierenden T-Zellen bei der Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen beim Pemphigus vulgaris. Einzelne T-Zell-Subpopulationen (Tfh-, Th2- und Th17-Zellen) produzieren das Zytokin IL-21 und können hierüber teils auch autokrin aktiviert werden (gepunktete Linie). Zusammen mit anderen zellulären Faktoren (nicht dargestellt) kann IL-21 die Aktivierung und Differenzierung von autoreaktiven B-Zellen in Plasmazellen (PZ) und Gedächtnis B-Zellen (GB) initiieren. Dsg3-spezifische Gedächtnis B-Zellen können nach Aktivierung in Autoantikörper-produzierende Plasmazellen differenzieren, und ein klinisches Rezidiv des PV auslösen.

Die antigenspezifische Analyse der autoreaktiven B-Zell-Subpopulationen bei PV-Patienten zeigt zudem, dass Dsg3-spezifischen Gedächtnis B-Zellen auch in Phasen einer klinischen Remission im peripheren Blut nachweisbar sind (Abb.4.19-4.20, S.47). Diese autoreaktiven Gedächtnis B-Zellen könnten nach erneuter Aktivierung eine Exazerbation der Erkrankung vorantreiben.

5.2 Die Rolle von IL-21 bei der T-Zell-vermittelten Pathogenese des PV

5.2.1 Bedeutung von Zytokinen bei der Pathogenese des PV

Zytokine nehmen eine entscheidende Rolle in der T-Zell-vermittelten Stimulation von autoreaktiven B-Zellen in der Immunpathogenese des Pemphigus ein, indem sie die Produktion von Autoantikörpern positiv und negativ modulieren (Giordano und Sinha, 2012). Ein vielschichtiges Netzwerk von Zytokinen, die von T-Zellen selbst, aber auch von anderen Immunzellen produziert werden, führt beim Pemphigus zur weiteren Differenzierung oder Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen und letztlich zur Produktion von pathogenen Antikörpern (Das et al., 2019). Aufgrund ihrer essentiellen Bedeutung bei der Modulation einer autoreaktiven Immunantwort stellen Zytokine auch eine mögliche therapeutische Zielstruktur dar. Eine erste klinische Studie mit dem gegen das Zytokin TNF-alpha gerichteten monoklonalen Antikörper Infliximab konnte allerdings keine Wirksamkeit bei Pemphiguspatienten zeigen (Hall et al., 2015), so dass gegen andere Zytokine gerichteten Theapien möglicherweise geeignet sind die Behandlung des PV zu verbessern. Die bei der Pathogenese des PV beteiligten Zytokine, welche sich vereinfacht in pro-inflammatorische (immunaktivierende) sowie anti-inflammatorische (immunregulative) Zytokine einteilen lassen, wurden durch serologische sowie *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bereits näher betrachtet (Tavakolpour et al., 2020). Th1-Zytokine, wie IL-2, Interferon-gamma und TNF-alpha, scheinen im Serum von PV-Patienten eher verringert vorzuliegen (Lee et al., 2017; Satyam et al., 2009), wobei in einzelnen Studien auch erhöhte Serumkonzentrationen dieser Zytokine beobachtet werden konnten (Timoteo et al., 2017; Keskin et al., 2008). Th2-Zytokine, wie IL-4, IL-6 oder auch IL-10 sind dagegen erhöht und werden daher im Allgemeinen als bedeutsam für die Pathogenese des Pemphigus angesehen (Huang et al., 2019; Satyam et al., 2009; Giordano und Sinha, 2012). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse für das Zytokin IL-21 zeigen die Beteiligung von weiteren Faktoren und T-Zell-Subpopulationen, wie Tfh- und Th17-Zellen, welche über das bestehende Th1/Th2 Paradigma hinausgehen, auf. Eine mögliche pathogene Rolle dieser T-Zell-Subpopulationen wurde bereits in Ansätzen beschrieben ist aber nicht hinreichend geklärt (Asothai et al., 2015; Xue et al., 2014; Yuan et al., 2017).

5.2.2 IL-21-Plasmakonzentrationen im peripheren Blut von Patienten

Das in dieser Arbeit betrachtete IL-21 ist ein pleiotropes Zytokin, welches hauptsächlich von einzelnen CD4⁺ T-Zellen, vor allem Th17-Zellen und Tfh-Zellen, und zu geringeren Anteilen von natürlichen Killer T-Zellen produziert wird (Spolski und Leonard, 2014; Coquet et al., 2007). Aufgrund der breiten Expression des IL-21-Rezeptors auf lymphoiden Zellen, wie T- und B-Zellen, und myeloiden Zellen wie Monozyten und dendritischen Zellen, kann IL-21 an verschiedenen Stellen des Immunsystems modulatorisch einwirken (Spolski und Leonard, 2014). Um eine mögliche Beteiligung von IL-21 bei der Immunantwort des Pemphigus zu klären, wurden zunächst die IL-21-Konzentrationen im Blutplasma von PV-Patienten bestimmt und mit gesunden Kontrollen verglichen (Abb.4.2, S.32). Hierbei konnte ein deutlich erhöhtes Vorkommen an IL-21 in der Gruppe der Patienten beobachtet werden, wohingegen die Kontrollen nur niedrige Mengen aufzeigten. Auffällig war ebenfalls, dass Konzentrationen, die über den Sensitivitätsbereich des verwendeten ELISA-Systems hinausgingen, nur für IL-21 und nicht für die im

Vergleich bestimmten Zytokine IL-4 und IL-17 detektiert werden konnten (Abb.4.2, S.32). Dies steht im Gegensatz zu bisherigen Studien in denen bereits IL-4 und IL-17 im Serum von Pemphiguspatienten detektiert werden konnte (Kowalski et al., 2019). Im Allgemeinen ist die Stabilität der im Blutplasma befindlichen Zytokine begrenzt. Die Halbwertszeit liegt bei nur wenigen Stunden (Zhou et al., 2010). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass es im Rahmen der zeitnahen Verarbeitung der Blutproben nach Blutentnahme zu einer teilweisen Zytokindegradation und damit zu einem verminderten messbaren Signal gekommen ist. Gleichwohl zeigen die Ergebnisse ein erhöhtes Vorkommen des Zytokins IL-21 im peripheren Blut der Patienten auf, wobei die tatsächlichen Konzentrationen beim Patienten unter Umständen sogar höher ausfallen können.

Bei der weiteren Betrachtung von IL-21 im Blutplasma mit Hinblick auf den individuellen Krankheitsstatus konnten erhöhte IL-21 Werte sowohl bei den aktiven als auch bei remittierenden Patienten beobachtet werden, wobei bei Letzteren die statistische Signifikanz nicht vollkommen erreicht wurde (Abb.4.3, S.33). Hierbei konnte allerdings keine Korrelation von IL-21 mit der Höhe der zirkulierenden Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3 beobachtet werden. Somit können auch bei niedrigen Autoantikörpertitern erhöhte IL-21 Werte beobachtet werden, was die Frage aufwirft, inwiefern IL-21 an der Produktion von Autoantikörpern beteiligt sein könnte. Ein möglicher zeitlich versetzter Einfluss von IL-21 auf die T-Zell-abhängige Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen ist denkbar. So zeigen die beispielhaft bei 2 PV-Patienten mit aktiver Erkrankung erhobenen longitudinalen Verläufe, dass die im Rahmen eines klinisches Rezidivs beobachteten IL-21 Werte mit der Höhe der Dsg3-Autoantikörper teilweise einhergehen, wobei dieser Zusammenhang allerdings nicht zu jedem Messzeitpunkt beobachtet werden konnte (Abb.4.4, S.34). Ein ähnlicher Zusammenhang konnte auch bereits bei anderen Antikörpervermittelten Autoimmunerkrankungen, wie der RA festgestellt werden (Liu et al., 2012; Rasmussen et al., 2010). Hier korreliert IL-21 ebenfalls mit der Aktivität der Erkrankung im Krankheitsverlauf und wird als relevant für die Krankheitspathogenese angesehen (Dinesh und Rasool, 2018). Die in dieser Arbeit durchgeführte longitudinale Betrachtung von IL-21 bei PV-Patienten lässt daher einen möglichen zeitlich verzögerten Einfluss von IL-21 auf die Produktion von Dsg3-Autoantikörpern vermuten, der auch durch die im Vergleich zum Zytokin IL-21 deutlich längeren Halbwertszeit von IgG-Antikörpern von 7-21 Tagen (Irani et al., 2015) erklärt werden könnte. Eine durch IL-21 induzierte gehemmte oder gesteigerte Produktion von Dsg3-Autoantikörpern würde somit erst mit zeitlicher Verzögerung im Blut der Patienten sichtbar werden. Ein solcher postulierter Effekt kann allerdings mit der in dieser Arbeit durchgeführten Querschnittstudie, mit einmalig am Patienten abgenommen Blutproben, nicht nachvollzogen werden. Es sind daher über diese Arbeit hinausgehende longitudinale Untersuchungen notwendig, um den Zusammenhang zwischen IL-21 und Autoantikörpern im peripheren Blut näher aufklären zu können.

5.2.3 Produktion von IL-21 durch CD4⁺ T-Zellen bei Patienten

Neben der Betrachtung der Konzentration von IL-21 im Blutplasma wurde die Produktion von IL-21 durch CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Hierbei zeigte vor allem die Gruppe der aktiven PV-Patienten eine starke Erhöhung von IL-21⁺ CD4⁺ T-Zellen wohingegen die zusätzlich bestimmten Zy-

tokine, IL-4 und IL-17, keinen Unterschied im Vergleich zu gesunden Kontrollen aufzeigten (Abb.4.6, S.35). Die zuvor beobachtete erhöhte Konzentration von IL-21 im Plasma geht somit mit einer erhöhten IL-21 Produktion von CD4⁺ T-Zellen einher, welches eine Beteiligung dieser T-Zell-Subpopulation bei der T-Zell-abhängigen Immunpathogenese des Pemphigus vermuten lässt. Die bei den Patienten detektierten IL-21⁺ T-Zellen produzierten vorrangig alleinig IL-21 und ließen sich durch die zusätzliche Bestimmung weiterer Markerzytokine (IL-17, IL-4, IL-10) nur in geringem Maße den T-Zell-Subpopulationen der Th17-, Th2- oder Treg-Zellen zuordnen (Abb.4.7, S.36). Demnach ist zu schlussfolgern, dass es sich hierbei um eine distinkte T-Zell-Population von IL-21-Einzelproduzenten zu handeln scheint, die sich auch für die erhöhten Konzentrationen von IL-21 im Plasma verantwortlich zeigt.

Th17-Zellen zeichnen sich neben der Sekretion des funktionell relevanten Zytokins IL-17 durch eine merkliche Produktion von IL-21 aus, welches als autokriner Faktor essentiell für die Aktivierung und Differenzierung von Th17-Zellen ist (Patel und Kuchroo, 2015). IL-21 wird von Th17-Zellen teils als autokriner Faktor produziert und verstärkt die IL-23-abhängige Differenzierung von Th17-Zellen durch eine gesteigerte Expression des IL-23-Rezeptors (Korn et al., 2007; Nurieva et al., 2007). Xu et al. konnte bereits eine erhöhte Anzahl von Th17-Zellen bei klinischen Rezidiven und bei aktiver Erkrankung des PV beobachten (Xu et al., 2013). In einer weiteren Studie von Asothai et al. zeigten sich ebenfalls erhöhte Frequenzen von Th17-Zellen im peripheren Blut von Patienten (Asothai et al., 2015). Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit allerdings keinen Unterschied in der Frequenz von Th17-Zellen bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abb.4.6, S.35), welches Fragen über die pathogenetische Relevanz dieser T-Zell-Subpopulationen aufwirft. Neben einen pathogenen Ursprung ist ein verstärktes Vorkommen von Th17-Zellen im Zuge einer allgemeinen Immunabwehr gegenüber Infektionen aufgrund der zerstörten Barrierefunktion der Haut der Patienten ebenfalls denkbar (Stockinger und Omenetti, 2017). Da Th17-Zellen wie oben erwähnt ebenfalls IL-21 sezernieren, kann davon ausgegangen werden, dass ein geringerer Teil des bei den PV-Patienten im Plasma vorkommenden IL-21 auch durch Th17-Zellen produziert wird, wobei diese allerdings nur eine kleine Subpopulation von IL-21-Produzenten darstellen. Auffälligerweise zeigten IL-21⁺ T-Zellen eine im Vergleich zu den anderen getesteten Zytokinen IL-17 und IL-10 stärkere Koproduktion des Th2-Markerzytokins IL-4 (Abb.4.7, S.36). Dies ist im Einklang mit bisherigen Studien, die vor allem Th2-Zytokine als bedeutsam für die Pathogenese des PV ansehen (Rizzo et al., 2005; Giordano und Sinha, 2012). Zusätzlich konnte bei IL-21⁺ T-Zellen eine nur sehr vereinzelt detektierbare Produktion des Zytokins IL-10 bestimmt werden. IL-10 kann immunregulatorisch von FoxP3⁺ Treg-Zellen produziert werden, wobei dies nicht auf diesen Zelltyp beschränkt ist (Maynard et al., 2007). Daneben kann IL-10 auch immunstimulatorisch wirken und bspw. die Antikörperproduktion von B-Zellen verstärken (Cho et al., 2015). Für PV-Patienten konnte bereits gezeigt werden, dass IL-10-produzierende Treg-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen stark verringert vorliegen (Veldman et al., 2004). Die sehr geringe IL-10 Produktion von IL-21⁺ T-Zellen lässt daher ebenfalls auf eine geringe immunregulatorische Funktion dieser Zellen schließen.

5.2.4 IL-21 und Tfh-Zellen in der Immunpathogenese des Pemphigus

Im Allgemeinen werden Tfh-Zellen als die Hauptproduzenten von IL-21 angesehen (Lüthje et al., 2012; Ma et al., 2012). IL-21 ist hierbei zum einen für die Differenzierung von Tfh-Zellen funktionell relevant (Vogelzang et al., 2008; Chtanova et al., 2004). Daneben spielt IL-21 eine essentielle Rolle bei der durch Tfh-Zellen initiierten Induktion einer Antikörper-vermittelten Immunantwort, welches in verschiedenen humanen Studien und im tierexperimentellen Modell gezeigt werden konnte (Spolski und Leonard, 2014, 2010). So induziert IL-21 durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors BLIMP-1 die Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-sezernierende Plasmazellen (Ozaki et al., 2004). Dieser Vorgang findet in den Keimzentren der lymphoiden Organe statt, für deren Ausbildung die Funktion und das Vorhandensein von Tfh-Zellen essentiell sind (Crotty, 2014). Tfh-Zellen exprimieren hierbei den Chemokinrezeptor CXCR5, der die Einwanderung in die B-Zell-Follikel erlaubt (Ansel et al., 1999; Kim et al., 2001). Hier kommt es zur engen Interaktion von Tfh-Zellen mit zunächst noch naiven B-Zellen, welche zuvor durch ihr spezifisches (Auto-)Antigen aktiviert wurden.

B-Zellen erhalten von Tfh-Zellen über die Interaktion mit CD28 und CD40-Ligand sowie den kostimulatorischen Moleküle ICOS und PD-1 entscheidende Überlebens- und Differenzierungssignale und entwickeln sich anschließend abhängig von den Stimulationsbedingungen und dem Zytokininmilieu in Antikörper-sezernierende Plasmazellen oder Gedächtnis B-Zellen (Victora und Nussenzweig, 2012). ICOS führt hierbei durch Interaktion mit dem ICOS-Liganden auf B-Zellen zu einer positiven Stimulation und ist für die Entwicklung von Tfh-Zellen unerlässlich (Panneton et al., 2019; Grimbacher et al., 2003). Dagegen liefert die Interaktion von PD-1 mit dem PD-1 Liganden auf B-Zellen ein inhibitorisches Signal, welches die übermäßige Proliferation von Tfh-Zellen verhindert (Good-Jacobson et al., 2010). Veränderungen in der Funktion und Zusammensetzung einzelner Tfh-Subpopulationen konnten bereits bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen beobachtet werden (Ueno, 2016). So konnten beispielsweise beim SLE bereits $CD4^+CXCR5^+$ bzw. $CD4^+CXCR5^+ICOS^{hi}$ oder $CD4^+CXCR5^+PD-1^{hi}$ Zellen beschrieben werden, die mit der Schwere der Erkrankung sowie den Autoantikörpern bzw. Antikörper-produzierenden Plasmablasten im peripheren Blut korrelieren (Xu et al., 2017; Zhang et al., 2015; Choi et al., 2015; Simpson et al., 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ebenfalls eine Veränderung innerhalb der Tfh-Zellen bei Patienten mit PV auf. So war die Zahl von zirkulierenden Tfh-Zellen, definiert als $CD4^+CXCR5^+$ T-Zellen (Morita et al., 2011) bei PV-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht (Abb.4.9, S.38), welches eine mögliche Beteiligung dieser Zellpopulation in der Pathogenese des PV nahelegt. Im Gegensatz zu Beobachtungen bei anderen Antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankungen, wie dem SLE, der RA oder der Myasthenia gravis, bei denen auch PD-1 oder ICOS erhöht bei Tfh-Zellen vorlagen (Simpson et al., 2010; Wang et al., 2013; Luo et al., 2013), konnten bei den PV-Patienten diesbezüglich keine Veränderungen beobachtet werden. Demzufolge scheinen Tfh-Zellen bezogen auf diese stimulatorischen Moleküle funktionell nicht verändert zu sein, liegen aber in erhöhter Anzahl vor, was auf eine gesteigerte Autoimmunreaktion im Zuge der gestörten Immuntoleranz bei den Patienten zurückzuführen sein könnte.

So ist zu vermuten, dass die erhöht vorliegenden Tfh-Zellen zum Teil durch vermehrt vorkommende autoreaktive T-Zellen begründet sind, welche nach der durch Antigen-präsentierende Zellen vermittelten Dsg3-spezifischen Aktivierung IL-21 produzieren und in der Folge autoreaktive B-Zellen aktivieren können. Diese Vermutung wird ebenfalls durch eine jüngst von Kim et al. veröffentlichte Untersuchung gestützt in der die Anzahl von CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ PD-1⁺ Zellen bei PV-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen ebenfalls unverändert war, allerdings eine starke Korrelation der Zellen mit Dsg3-Autoantikörpern beobachtet werden konnte (Kim et al., 2020). Um den Prozess der antigen-spezifischen IL-21 Sekretion von autoreaktiven T-Zellen experimentell nachzuvollziehen, wurden in dieser Arbeit T-Zellen von Patienten *in vitro* mit Dsg3 stimuliert und anschließend mittels des sensitiven ELISpot-Verfahrens untersucht. Bei über der Hälfte der Patienten lagen IL-21-produzierende autoreaktive T-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen vor (Abb.4.8, S.37). Interessanterweise konnte dies sowohl bei aktiven als auch remittierenden Patienten beobachtet werden, demzufolge autoraktive T-Zellen auch in Phasen einer Remission vorliegen und somit das Potenzial für die Entstehung eines klinischen Rezidivs bieten.

5.3 Querschnittsanalyse der identifizierten autoreaktiven B-Zell-Subpopulationen

5.3.1 Bedeutung von autoreaktiven B-Zellen bei der Pathogenese des PV

Die Bildung von Blasen an der Haut und den Schleimhäuten beim PV wird maßgeblich durch im Blut zirkulierende Autoantikörper hervorgerufen (Pollmann et al., 2018; Bystryn und Rudolph, 2005), welches durch eine Vielzahl von *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen bestätigt werden konnte (Kasperkiewicz et al., 2017). Die Auffassung wird zusätzlich durch die allgemein vorhandene Korrelation von Dsg1- und Dsg3-Autoantikörpern mit der Schwere der Erkrankung und der guten therapeutischen Wirksamkeit von Therapieformen, die eine schnelle Reduktion der Autoantikörpern hervorrufen, wie der B-Zell-Depletion und der Immunapharese, bekräftigt (Harman et al., 2001; Hebert und Joly, 2018; Eming und Hertl, 2006; Eming et al., 2006). Die Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen als Produzenten von Dsg3-Autoantikörpern ist daher für die Entstehung und Ausprägung des Pemphigus von entscheidender Bedeutung. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen vor allem die Präsenz von Dsg3-spezifischen Gedächtnis B-Zellen bei PV-Patienten auf, deren Hemmung ein bedeutsames spezifisches therapeutisches Ziel darstellen könnten. So verfolgt bspw. ein derzeitiger therapeutischer Ansatz die Infusion von genetisch modifizierten T-Zellen, welche autoreaktive B-Zellen über ihren Dsg3-spezifischen B-Zell-Rezeptor erkennen und eliminieren können (Ellebrecht et al., 2019). Eine Technologie, die bereits bei der spezifischen Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt wird (June et al., 2018). Die Wirksamkeit der Therapie mit solchen Dsg3 *chimeric auto-antibody receptor* (CAAR)-T-Zellen konnte bereits eindrucksvoll in einem prä-klinischen Mausmodell des PV demonstriert werden (Ellebrecht et al., 2016), wobei eine Erprobung bei PV-Patienten im Rahmen einer klinischen Studie noch aussteht (Didona et al., 2019).

5.3.2 Evaluation des durchflusszytometrischen Testverfahrens zur Detektion von Dsg3-spezifischen B-Zellen

Die in dieser Arbeit durchgeführte spezifische Detektion von autoreaktiven B-Zellen mittels Durchflusszytometrie sollte die Möglichkeit einer eingehenderen Analyse der am PV beteiligten B-Zell-Subpopulationen eröffnen, um die Pathogenese der Erkrankung besser zu verstehen. Hierfür wurde zunächst ein durchflusszytometrisches Testsystem zur Detektion von autoreaktiven B-Zellen etabliert (Abschnitt 4.3), bei dem rekombinantes Dsg3 mit dem Fluorochrom AF647 markiert und das so generierte Dsg3-AF647 Protein zur Färbung von antigen-spezifischen B-Zell-Rezeptoren verwendet wurde. Ein ähnlicher Ansatz wurde beispielsweise bereits erfolgreich zur Detektion von Tetanus-Toxoid-spezifischen B-Zellen nach einer Impfauffrischung verwendet (Frölich et al., 2010; Odendahl et al., 2005). Auch in anderen Autoimmunerkrankungen, wie dem SLE oder der rheumatoiden Arthritis, wurden bereits unterschiedliche durchflusszytometriebasierte Detektionssysteme entwickelt, die wichtige Erkenntnisse über die Entwicklung und Ausprägung von autoreaktiven B-Zellen bei Autoimmunpatienten ermöglicht haben (Gies et al., 2017; Ricard et al., 2019; Zhang et al., 2008; Cambridge et al., 2014). Die Herausforderung bei der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung lag darin, die im Vergleich zu einer aktiven Impfmunisierung deutlich niedriger zu erwartenden Frequenzen von

autoreaktiven B-Zellen (Giltiay et al., 2012), die bei der Autoimmunerkrankung PV im Blut zirkulieren, detektieren zu können. Um die Spezifität und Sensitivität des Testsystems zu überprüfen, wurden B-Zell Klone mit bekannter Spezifität durch Klonierung von Dsg3-reaktiven murinen B-Zell-Hybridomzelllinien generiert und anschließend als Positiv- und Negativkontrolle zur Evaluierung der Färbung mit Dsg3-AF647 verwendet (Abschnitt 4.3.1). Die hierbei durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass Dsg3-AF647 an den Dsg3-spezifischen B-Zell-Klon 2C10 über den B-Zell-Rezeptor in ausreichender Sensitivität bindet (0,7 % aller Zellen; Abb.4.14, S.43). Jedoch zeigte der als Negativkontrolle verwendete Klon 1F12 auch ein leicht positives Fluoreszenzsignal, was auf eine geringfügige unspezifische Bindung von Dsg3-AF647 hinweist und die beschriebene Sensitivität des Testsystems beschränkt. Um die Sensitivität des Testsystems in zukünftigen Analysen noch weiter zu erhöhen, bietet sich eine zusätzliche Markierung des rekombinanten Dsg3-Proteins mit einem weiteren Fluorochrom an, um anschließend bei der durchflusszytometrischen Analyse nur jene Zellen zu betrachten die für beide Fluorochrome ein positives Fluoreszenzsignal zeigen. Dieser Ansatz wurde bereits bei den Untersuchungen von antigenspezifischen B-Zellen im Kontext anderer Autoimmunerkrankungen verwendet (Boonyaratanakornkit und Taylor, 2019; Gatto et al., 2019; Gilman et al., 2016), konnte aber mit dem in dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometer (Abschnitt 3.6) aus praktischen Gründen nicht durchgeführt werden. Das Gerät ist auf die gleichzeitige Detektion von 4 Fluoreszenzparametern limitiert, weswegen die Identifikation der humanen B-Zell-Subpopulation über die Bestimmung der 3 Oberflächenmarker CD19, CD27 und CD38 nicht weiter eingeschränkt werden konnte. Im Bewusstsein dieser Limitation wurden daher bei der Analyse der Dsg3-spezifischen B-Zellen bei PV-Patienten nur B-Zellen mit einem erkennbar starken AF647-Fluoreszenzsignal einbezogen (Abb. 3.4, S.25).

5.3.3 Verteilung von Dsg3-spezifischen B-Zell-Subpopulationen bei Patienten mit PV

Durch die durchflusszytometrischen Detektion von Dsg3-spezifischen B-Zellen konnten niedrigfrequente autoreaktive B-Zellen bei Patienten mit PV detektiert und hinsichtlich ihrer Subpopulation genauer analysiert werden. Es wurden signifikant erhöhte Dsg3-spezifische B-Zellen innerhalb des gesamten B-Zell-Repertoires beobachtet, wobei eine starke Erhöhung in der Subpopulation der autoreaktiven Gedächtnis B-Zellen auffällig war (Abb.4.17, S.45). Im Folgenden soll auf die auffälligen Beobachtungen bei der Bestimmung von Dsg3-spezifischen B-Zellen bei den PV-Patienten und Kontrollen eingegangen werden. Zusätzlich werden dabei die B-Zell-Subpopulationen der Gedächtnis B-Zellen und Plasmablasten näher betrachtet.

Frequenzen von autoreaktiven B-Zellen bei PV-Patienten

Im Allgemeinen sind die Frequenzen der im peripheren Blut zirkulierenden autoreaktiven B-Zellen bei Patienten mit Pemphigus und auch anderen Autoimmunerkrankungen sehr gering. So wurden bei der bereits sehr gut untersuchten Antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankung SLE gegen DNA oder andere Autoantigene gerichtete autoreaktive B-Zellen bereits näher untersucht, welche hier in einer niedrigen Frequenz von deutlich unter 1 Prozent anteilig an allen B-Zellen vorlagen (Gatto et al., 2019; Jacobi et al., 2009; Zhang et al., 2008). Auch beim PV wur-

den bereits in einer Studie von Nishifuji et al. die Frequenz von Dsg3-spezifischen Gedächtnis B-Zellen im Blut von PV-Patienten untersucht (Nishifuji et al., 2000). Die Detektion erfolgte hierbei im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten durchflusszytometrischen Testverfahren mittels ELISpot-Analyse. Autoreaktive B-Zellen wurden hier mit einer niedrigen Frequenz von 6.3 – 84.0 Zellen pro 10^5 PBMC gefunden, welches vergleichbar zu der mittels Dsg3-AF647 bestimmten Frequenz von (0.11-0.53% von CD19⁺ B Zellen) ist, wobei die unterschiedliche Methodik zur Detektion der Zellen nur einen eingeschränkten Vergleich zulässt. Festzuhalten ist hierbei, dass beide Methoden insgesamt sehr niedrige Frequenzen von autoreaktiven B-Zellen im Blut der Patienten aufzeigen. In der Arbeit von Nishifuji et al. konnten Dsg3-spezifische Plasmablasten, die spontan Dsg3-Autoantikörper produzieren, ausschließlich bei aktiven Patienten mit hoher Krankheitsaktivität gefunden werden, wohingegen Dsg3-spezifische Gedächtnis B-Zellen nach *in vitro*-Stimulation bei 9 der 14 untersuchten Patienten sowohl mit aktiver als auch remittierender Erkrankung nachgewiesen wurden (Nishifuji et al., 2000).

Vorkommen von autoreaktiven B-Zellen bei Gesunden

Im Allgemeinen können Dsg3-Autoantikörper vom Typ IgG bei gesunden Individuen nur sehr vereinzelt und in sehr geringen Konzentrationen gefunden werden (Prüßmann et al., 2015). Es ist daher zu vermuten, dass die zum Teil in der gesunden Kontrollgruppe detektierten Dsg3-spezifischen B-Zellen apathogene, natürliche Autoantikörper vom Typ IgM darstellen (Lobo, 2016; Wardemann et al., 2003), welches allerdings nicht näher untersucht wurde. Eine zusätzliche durchflusszytometrische Bestimmung von membranständigen IgG und IgM bei den Dsg3-spezifischen B-Zellen von Patienten und Kontrollen bietet sich zur Beantwortung dieser Frage an. Zusätzlich können die durch Dsg3-AF647 markierten Dsg3-spezifischen B-Zellen mittels *FACS sorting* isoliert und *in vitro* zur Antikörperproduktion angeregt werden, um die Antigenpezifität und Ig-Subklasse (IgG, IgM oder IgE) der Autoantikörper mittels ELISA genau zu bestimmen. Für natürliche Autoantikörper vom Typ IgM konnte bereits im Tiermodell des SLE gezeigt werden, dass erhöhte Spiegel oder die Infusion von IgM-Autoantikörpern (i.d.F. gegen doppelsträngige DNA gerichtet) zu einer Verringerung der Krankheitsaktivität führen können (Mannoor et al., 2012; Werwitzke et al., 2005) und sie somit eher eine Toleranz gegenüber Autoantigenen vermitteln, was das Vorkommen von niedrigfrequenten autoreaktiven B-Zellen bei der gesunden Kontrollgruppe erklären könnte.

Vorkommen von autoreaktiven Gedächtnis B-Zellen bei PV-Patienten

Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen, bei denen ein IgG-Klassenwechsel stattgefunden hat, entwickeln sich aus der Keimzentrumsreaktion innerhalb der lymphoiden Organe bei der es durch die Interaktion von Tfh-Zellen zur weiteren Differenzierung von naiven B-Zellen kommt (Kurosaki et al., 2015). Daneben können Gedächtnis B-Zellen auch unabhängig von Keimzentren entstehen, wobei diese Gedächtnis B-Zellen eine geringere Antigenaffinität bzw. keinen Klassenwechsel aufweisen (Taylor et al., 2012; Kaji et al., 2012). Das Vorliegen von Dsg3-spezifischen Gedächtnis B-Zellen bei PV-Patienten (Abb.4.17, S.45) weist auf eine Aktivierung und Differenzierung von autoreaktiven B-Zellen innerhalb der Keimzentren der lymphoiden Or-

gane hin. Diese Annahme wird zusätzlich durch die erhöhte Frequenz von Tfh-Zellen im peripheren Blut der PV-Patienten und das Vorliegen von autoreaktiven T-Zellen, die das für die Funktion von Tfh-Zellen relevante Zytokin IL-21 produzieren (Abschnitt 5.2.4, S.52), gestützt und lassen eine gestörte Immuntoleranz an diesem Punkt der B-Zell Entwicklung vermuten. Bei vielen Autoimmunerkrankungen konnten solche Defekte in den einzelnen Kontrollpunkten (*checkpoints*) der Immuntoleranz bereits beschrieben werden (Meffre und O'Connor, 2019), wobei zwischen Regulationsmechanismen der zentralen Toleranz während der frühen B-Zell-Entwicklung im Knochenmark und peripheren Toleranzmechanismen im Laufe der weiteren B-Zell-Entwicklung in den lymphoiden Organen und anderen Kompartimenten unterschieden wird (Nemazee, 2017; Tsubata, 2017). Das Vorliegen von autoreaktiven Gedächtnis B-Zellen weist auf eine gestörte periphere Immuntoleranz hin. Solche autoreaktiven Gedächtnis B-Zellen, die auch bei Patienten in klinischer Remission beobachtet wurden, könnten nach einer erneuten Immunaktivierung die Entstehung eines klinischen Rezidivs begünstigen, worauf an anderer Stelle (Seite 60) näher eingegangen werden soll.

Fehlende autoreaktive Plasmablasten bei PV-Patienten

Auffälligerweise konnten Dsg3-spezifische Plasmablasten, welche aktive antikörpersezernierende B-Zellen darstellen, nur in sehr geringem Maße detektiert werden (Abb.4.17, S.45). Da Plasmablasten im Vergleich zu anderen B-Zell-Subpopulationen eine deutlich reduzierte Expression des B-Zell-Rezeptors aufweisen (Perez-Andres et al., 2010), könnte dies die Detektion dieser Zellen mittels des fluoreszenzmarkierten Dsg3-AF647 beeinträchtigen. Trotz der geringen Frequenz von autoreaktiven Plasmablasten konnten Dsg3-Autoantikörpertiter bei einer Vielzahl der untersuchten PV-Patienten beobachtet werden (Abb.4.18, S.46). Eine Korrelation der Dsg3-spezifischen B-Zellen mit anti-Dsg3-IgG wurde jedoch nicht festgestellt, woraus sich die Frage ergibt, ob die im Blut zirkulierenden Plasmablasten hauptsächlich für die Sekretion von Dsg3-Autoantikörpern verantwortlich sind oder B-Zellen in anderen Kompartimenten (Abschnitt 5.3.4, S.58) hier eine Rolle spielen.

Beim Pemphigus geht man aufgrund der guten therapeutischen Wirksamkeit der Behandlung mit dem anti-CD20 Antikörper Rituximab davon aus, dass die Dsg-Autoantikörper vorrangig durch kurzlebige Plasmazellen produziert werden, deren Depletion zu einer schnellen und nachhaltigen Reduktion von zirkulierenden Autoantikörpern bei den Patienten führt (Hale et al., 2018; Joly et al., 2017; Mouquet et al., 2008). Dennoch lassen die Beobachtungen von Patienten mit klinischen Redizidiv nach einer Rituximabbehandlung vermuten, dass langlebige Plasmazellen bei einem Teil der Patienten zu anhaltenden Autoantikörpertitern beitragen könnten, wobei es hierbei auch eine Rolle zu spielen scheint, ob die B-Zell-Depletion zu einem frühen oder späten Zeitpunkt des Krankheitsverlauf erfolgte (Mignard et al., 2020; Lunardon et al., 2012). Solche langlebigen Plasmazellen wandern nach ihrer Differenzierung in das Knochenmark ein und können von hier aus große Mengen Antikörper produzieren und zu lang anhaltenden protektiven antigen-spezifischen Antikörpertitern (wie zum Beispiel bei Impfungen gegen Masern oder Tetanus) beitragen (Hoyer und Radbruch, 2017). Zusätzlich wird aber angenommen, dass auch langlebige pathogene autoreaktive Plasmazellen ebenfalls zur Entstehung von Autoim-

munerkrankungen, wie dem SLE beitragen können (Hiepe und Radbruch, 2016; Hiepe et al., 2011), wobei die Rolle dieser Zellen beim Pemphigus nicht geklärt ist.

Die in dieser Arbeit beobachtete geringe Frequenz von Dsg3-spezifischen Plasmablasten sowie die nicht vorhandene Korrelation von autoreaktiven B-Zellen mit den Dsg3-Autoantikörpern im Blut der Patienten (Abb.4.18, S.46) lässt daher eine Beteiligung weiterer autoreaktiver B-Zell-Subpopulationen außerhalb des peripheren Blutes vermuten. Aufgrund ihrer Lokalisation im Knochenmark und der nicht vorhandenen oder nur geringen Expression von CD20 werden langlebige Plasmazellen durch die Therapie mit dem anti-CD20-Antikörper Rituximab nicht erfasst. In diesem Zusammenhang konnten einzelne Fallberichte zeigen, dass eine allogene Stammzelltransplantation, bei der auch langlebige Plasmazellen zusammen mit weiteren Immunzellen des Knochenmarks vollständig depletiert werden, zu einer klinischen Remission bei Patienten mit Pemphigus führen kann (Vanikar et al., 2007; Oyama et al., 2004). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass dies auch auf eine allgemein wiederhergestellte Immuntoleranz gegenüber Dsg3 zurückzuführen ist, die die *de novo* Synthese neuer autoreaktiver T- und B-Zell-Klone verhindert.

5.3.4 Vorkommen von autoreaktiven B-Zellen in anderen Kompartimenten

Inwieweit autoreaktive B-Zellen in anderen Kompartimenten des Körpers, d.h. außerhalb der Zirkulation, vorkommen und für die Pathogenese des PV bedeutsam sind, kann in dieser Arbeit aufgrund der Restriktion der Untersuchung auf das periphere Blut der Patienten nicht geklärt werden. Es wird im Allgemeinen aber davon ausgegangen, dass Dsg3-spezifische B-Zellen über das periphere Blut zwischen den lymphoiden Organen (v.a. Lymphknoten und Milz) zirkulieren und es hier zur weiteren Differenzierung kommt (Kasperkiewicz et al., 2017). Eine Studie von Yuan et al. konnte hierzu zudem zeigen, dass Dsg3-spezifische B-Zellen auch direkt in der läsionalen Haut von Patienten mit PV gefunden werden können (Yuan et al., 2017). Eine weitere auf diesen Ergebnissen aufbauende Untersuchung legt zudem den Schluss nahe, dass die Differenzierung von autoreaktiven B-Zellen in tertiären lymphoiden Strukturen (TLS) der Haut stattfinden kann (Zhou et al., 2020). Die Autoren dieser Arbeit vermuten, dass die hierbei entstehenden B-Zell-Klone zwischen dem peripheren Blut und der Haut zirkulieren können und in der Haut Autoantikörper produzieren. Inwieweit diese lokale hautständige Autoantikörperproduktion initial die Blasenbildung beim PV auslöst oder erst ein immunologisch nachfolgendes Ereignis darstellt, ist derzeit eine noch offene Forschungsfrage (Nomura und Amagai, 2020). Dennoch könnten solche Vorgänge in der Haut erklären helfen, warum es trotz der bei den Patienten in der Zirkulation vorhandenen Dsg-spezifischen Autoantikörpern nur zu einer lokalen, meist auf bestimmte Prädispositionsstellen, wie Mundschleimhaut, Kopfhaut und Oberkörper, begrenzten Blasenbildung kommt. Zur Klärung dieser Frage bietet sich die Verwendung des in dieser Arbeit etablierten Testsystems mit Dsg3-AF647 zur gezielten Analyse von läsionalen autoreaktiven B-Zellen in der Haut von PV-Patienten an.

5.3.5 Dsg3-spezifische Gedächtnis B-Zellen im Kontext einer Rituximabtherapie

In einer Subgruppenanalyse wurden zusätzlich 5 PV-Patienten, die in den Monaten vor der Untersuchung eine B-Zell-Depletion mit dem anti-CD20 Antikörper Rituximab erhielten, hinsichtlich der Verteilung von Dsg3-spezifischen B-Zell-Subpopulationen näher betrachtet (Abb.4.20, S.47). Aufgrund des guten klinischen Ansprechens vieler Patienten auf Rituximab ist diese Therapieform in den letzten Jahren zunehmend zunächst als *off-label* Therapie eingesetzt worden (Hebert und Joly, 2018; Kasperkiewicz et al., 2012; Colliou et al., 2013). Die gute therapeutische Wirksamkeit von Rituximab bei der Behandlung des PV konnte dabei in einer Vielzahl von Verlaufstudien aufgezeigt werden (Joly et al., 2007; Eming et al., 2008; Ran und Payne, 2017). So zeigen die Ergebnisse einer aktuellen klinischen Phase-III-Studie deutlich bessere Remissionsraten bei einer Rituximab-Behandlung (in Kombination mit einer kurzzeitigen Gabe von Prednisolon) im Vergleich zu einer langzeitigen Monotherapie mit Prednisolon (Joly et al., 2017). Nach der B-Zell-Depletion konnte bei 89,5% der PV-Patienten eine vollständige Remission für 2 oder mehr Monate nach Beendigung der Therapie erzielt werden, während dies bei nur 27,8 % der Patienten der Fall war, die nur Glukokortikoide erhielten. Weitere *post-hoc* Analysen der Studiendaten konnten zusätzlich die bessere therapeutische Wirksamkeit von Rituximab im Vergleich zu Prednisolon demonstrieren (Chen et al., 2020; Scorer et al., 2020). Die Ergebnisse dieser und anderer Studien führten daher jüngst zur offiziellen Zulassung von Rituximab zur Behandlung von mittelschweren bis schweren Fällen des Pemphigus (European Medicines Agency, 2019; van Beek et al., 2019), welche inzwischen zunehmend auch als *first line* Therapie eingesetzt wird (Scorer et al., 2020).

Trotz der guten Wirksamkeit von Rituximab, kommt es dennoch bei einer Vielzahl von Patienten nach einer ersten Phase der Remission im Zuge der Repopulation von B-Zellen im peripheren Blut zur erneuten klinischen Exazerbation und erhöhten Titern von Dsg3-Autoantikörpern. Das primäre therapeutische Ziel einer Langzeitremission ohne systemische Immunsuppression kann daher auch hier nur bei einem Teil der Patienten erreicht werden. In einer von Ahmed und Shetty durchgeführten umfassenden Meta-Analyse mit 499 Rituximab-behandelten Patienten zeigte sich, dass es bei etwa der Hälfte der Patienten zu einer Exazerbation im Mittel im zweiten Jahr nach der Behandlung kam (Ahmed und Shetty, 2015). Zudem musste bei über 60 % der in dieser Studie betrachteten Patienten eine wiederholte Rituximabbehandlung aufgrund einer Befundverschlechterung erfolgen. Diese Daten legen nahe, dass es ab einem bestimmten Zeitpunkt während einer klinischen Remission zu einer Repopulation oder Reaktivierung von Dsg3-spezifischen B-Zellen kommt, die in der Folge durch die Produktion von pathogenen Dsg3-Autoantikörpern zu einer erneuten verstärkten Krankheitsaktivität beitragen.

Bei den in dieser Arbeit analysierten 5 PV-Patienten, die vor der Untersuchung Rituximab erhielten, lässt sich ebenfalls eine auffällige Verbindung zwischen der Zeitspanne nach Behandlung mit Rituximab und dem Vorkommen von autoreaktiven Gedächtnis B-Zellen vermuten. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass Dsg3-spezifische Gedächtnis B-Zellen bei remittierenden Patienten im Zeitraum von 22 bis 27 Monaten nach der Rituximab-Behandlung vermehrt vorlagen, während nach 9 Monaten in Remission und bei aktiver Exazerbation nur geringe Fre-

quenzen detektiert werden konnten (Abb.4.20, S.47). Zwar lassen sich aufgrund der kleinen Patientenzahl nur bedingt generalisierte Aussagen über die Ausprägung von Gedächtnis B-Zellen im Verlauf einer Rituximab-Behandlung treffen, doch lassen diese Daten eine stete Repopulation des peripheren Blutes mit autoreaktiven Gedächtnis B-Zellen nach einer B-Zell-Depletion vermuten. Auch in anderen Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, konnten solche persistierende autoreaktive Gedächtnis B-Zellen bei Patienten in Remission bereits beobachtet werden (Pelzek et al., 2017; Nei et al., 2019).

Autoreaktive Gedächtnis B-Zellen als Reservoir für ein klinisches Rezidiv des PV

Autoreaktive Gedächtnis B-Zellen bei den PV-Patienten produzieren zunächst keine Autoantikörper, bergen aber bei vermehrten Vorkommen während einer klinischen Remission das Potenzial, sich nach Aktivierung zu Plasmazellen zu differenzieren, welche in der Folge Dsg3-Autoantikörper produzieren und zu einer Exazerbation des PV führen könnten. Dies würde erklären, warum Dsg3-spezifische Gedächtnis B-Zellen nicht mit den Dsg3-Autoantikörpern im Serum der Patienten korrelieren (Abb.4.18, S.46). Weitere derzeit diskutierte, aber noch nicht vollständig verstandene endogene *trigger*-Faktoren, wie zum Beispiel Medikamenteneinnahme, virale Infektionen, emotionaler Stress und Ernährungsgewohnheiten (Tavakolpour, 2018) sowie die Exposition mit dem Autoantigen Dsg3, könnten ebenfalls einen verstärkenden Einfluss auf die Aktivierung von Gedächtnis B-Zellen haben. Die Tatsache, dass nach klinischer Exazerbation bei einem zuvor mit Rituximab behandelten Patienten keine erhöhte Anzahl von Dsg3-spezifischen Gedächtnis B-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb.4.20, S.47), lässt eine vorausgegangene Differenzierung in Plasmazellen vermuteten, wobei diese Hypothese mit den vorliegenden Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten Querschnittsanalyse nicht abschließend beantwortet werden kann. Weiterführende longitudinale Untersuchungen sind hierfür notwendig bei denen die Frequenz und Subpopulationen von Dsg3-spezifische B-Zellen bei PV-Patienten im zeitlichen Verlauf der Erkrankung beim Übergang von verschiedenen Krankheitszuständen (aktiv, Remission, Rezidive) bestimmt werden, um die zeitliche Kinetik von autoreaktiven B-Zellen beim Pemphigus besser nachvollziehen zu können.

Erste Hinweise, dass eine Reaktivierung von autoreaktiven B-Zellen für die Pathogenese des PV bedeutsam ist, zeigen die Ergebnisse einer jüngsten Studie von Cho et al. auf, in der Dsg3-spezifische B-Zell-Subpopulationen bei Diagnosestellung, während einer durch Rituximab erzielten klinischen Remission und bei einem Rezidiv des PV untersucht wurden (Cho et al., 2019). Dsg3-spezifische B-Zellen waren hier ebenfalls insbesondere im Kompartiment der Gedächtnis B-Zellen auffällig erhöht und Dsg3-spezifischen Gedächtnis B-Zellen korrelierten mit den Dsg3-Autoantikörpern von aktiven PV-Patienten im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen (Abb.4.18, S.46). Die Autoren vermuten daher, dass kurzlebige Plasmazellen kontinuierlich aus diesem Gedächtnis B-Zell Reservoir gespeist werden und so zu den beim Patienten nachweisbaren Autoantikörpertitern beitragen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten auch von Cho et al. keine Dsg3-spezifischen Plasmablasten gefunden werden, welches für das Vorhandensein von eher kurzlebigen Plasmazellen beim PV spricht. Die longitudinale Analyse eines individuellen PV-Patienten zeigte zudem,

dass Dsg3-spezifische Gedächtnis B-Zellen bereits 15 Monate vor einem Rezidiv im peripheren Blut gefunden werden konnten und affinitätsgereifte Antikörper produzieren (Cho et al., 2019), welches eine mögliche Beteiligung dieser Zellen bei der Entstehung eines klinischen Rezidivs zusätzlich unterstreicht.

Ob die über diesen postulierten Aktivierungsmechanismus auftretenden autoreaktiven B-Zell Klone erst nach der Rituximab induzierten B-Zell-Depletion neu gebildet werden oder ob es sich um bereits vor der Behandlung bestehende Klone handelt, welche therapeutisch nicht vollständig ausgelöscht wurden und weiterhin im Patienten persistieren, ist momentan noch nicht abschließend geklärt. Verschiedene Studien zu dieser Frage haben zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt. In einer von Hammers et al. durchgeführten Untersuchung wurden die im peripheren Blut vorkommenden B-Zell-Klone bei zwei PV-Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung über insgesamt 14 Jahre beobachtet (Hammers et al., 2015). Es zeigte sich, dass sich die Anzahl und Spezifität der Klone über die Zeit nur geringfügig veränderte. Die Autoren schließen daraus, dass es bei PV-Patienten eine limitierte Anzahl an B-Zell-Klonen gibt, welche für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung verantwortlich sind, wobei es hierbei fraglich ist, ob die Ergebnisse der Untersuchung an zwei individuellen Patienten auf die Gesamtheit aller PV-Patienten übertragen werden können (Hammers et al., 2015). Im Gegensatz zu dieser Untersuchung konnte in einer weiteren Studie von Chen et al., bei der Dsg1- und Dsg3-Autoantikörper im Serum von Patienten untersucht wurden, ein sehr polyklonales Autoantikörperrepertoire mit verschiedenen nur teilweise persistierenden Klonen festgestellt werden (Chen et al., 2017).

5.4 Fazit und Ausblick

Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse konnten neue Einblicke in die zellulären und humoralen Mechanismen der adaptiven Autoimmunantwort des PV gewonnen werden, welche aufgrund des modellhaften Charakters der Autoimmunerkrankung Pemphigus dazu dienen können, die Entwicklung von zielgerichteten Therapieformen für die Behandlung von Patienten mit PV oder anderen Autoantikörper-vermittelten Autoimmunerkrankung zu ermöglichen.

Die Ergebnisse liefern erste grundlegende Erkenntnisse über die Rolle des Zytokins IL-21 bei der Pathogenese des PV. Neben erhöhten Spiegeln dieses Zytokins im Plasma von Patienten wurden IL-21-produzierende T-Zellen nachgewiesen, welche insbesondere bei aktiver Erkrankung erhöht vorlagen. Diese T-Zellen wurden als IL-21-Einzelproduzenten charakterisiert, wobei ein geringerer Teil der Zellen auch IL-17 und IL-4 koproduzierte. Zusätzlich ließen sich Tfh-Zellen, die als Hauptproduzenten von IL-21 angesehen werden, vermehrt im peripheren Blut der PV-Patienten finden. Aufgrund der essentiellen Bedeutung von IL-21 bei der T-Zell-vermittelten Induktion von (Auto)-Antikörpern ist eine Beteiligung von IL-21-produzierenden T-Zellen und hierbei vor allem Tfh- oder auch Th17-Zellen bei der Entstehung und Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen beim PV naheliegend. Durch den in dieser Arbeit erfolgten erstmaligen Nachweis von autoreaktiven T-Zellen, die *in vitro* nach Dsg3-Stimulation IL-21 produzierten, konnte die funktionelle Bedeutung von IL-21 zusätzlich unterstrichen werden.

Um näher Aufschluss über die IL-21-abhängige Induktion von Autoantikörpern beim PV zu erhalten, bietet sich in weiteren Untersuchungen die gezielte Kokultivierung von aus dem Blut der Patienten isolierten Tfh- und anderen T-Zell-Subpopulationen, wie Th17-Zellen, mit naiven B-Zellen an. In einem solchen System kann über die Stimulation mit Dsg3 die Fähigkeit der T-Zellen eine Dsg3-spezifische Autoantikörperantwort zu induzieren experimentell genauer nachvollzogen werden. Inwieweit IL-21 für diesen Vorgang von essentieller Bedeutung ist, kann weiterhin über Inhibition durch Zugabe eines neutralisierenden anti-IL-21 Antikörpers überprüft werden. Diese Untersuchungen können dazu beitragen, die Rolle von IL-21 bei der Pathogenese des PV weiter aufzuklären und zukünftige gegen IL-21 gerichtete Therapien zur Behandlung des PV ermöglichen. Januskinase (JAK)3-Inhibitoren wie Tofacitinib, das neben IL-21 zur Blockierung weiterer Zytokine, wie IL-4 und IL-15 führt, oder monoklonale anti-IL-21 Antikörper kämen hierbei zur Behandlung in Frage (Tavakolpour, 2016).

Darüber hinaus erfolgte in dieser Arbeit der methodisch anspruchsvolle Nachweis von autoreaktiven B-Zellen im peripheren Blut der Patienten, die, wie bei anderen Autoimmunerkrankungen auch, in einer sehr niedrigen Frequenz vorlagen. Hierfür wurde ein durchflusszytometrisches Testsystem zur Detektion von Dsg3-spezifischen B-Zellen unter Zuhilfenahme von murinen B-Zell-Hybridomzellen, die zuvor durch Klonierungsexperimente gewonnen wurden, entwickelt. Über diese Arbeit hinaus bietet sich die Verwendung des Testsystems bspw. auch bei einer derzeit an der Klinik für Dermatologie und Allergologie Marburg durchgeführten multizentrischen klinischen Studie Phase-I-Studie (DRKS00020286) an, bei der ein neuer auf der intravenösen Gabe von Dsg3-Peptid-gekoppelten Nanopartikeln basierender therapeutischer Ansatz zur Be-

handlung des PV untersucht wird, um den Effekt der Behandlung auf autoreaktive B-Zellen nachvollziehen zu können.

Durch die in dieser Arbeit erfolgte gezielte Analyse von autoreaktiven B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut der Patienten wurden insbesondere Dsg3-spezifische Gedächtnis B-Zellen in Phasen einer klinischen Remission nach erfolgter Rituximabbehandlung beobachtet, die auf eine gestörte periphere Immuntoleranz an diesem Punkt der B-Zell-Entwicklung hinweisen. Allerdings sind einzelne Charakteristika der identifizierten autoreaktiven Gedächtnis B Zellen bisher nicht vollständig aufgeklärt. In weiterführenden Untersuchungen bietet sich an, diese mittels FACS sorting zu isolieren und in vitro durch polyklonale Stimulation zur Antikörperproduktion anzuregen. Die anschließende Bestimmung der Ig-Subklasse, wie IgM, IgG, und IgE, der sezernierten Antikörper gibt dabei näheren Aufschluss über die funktionelle Rolle dieser Antikörper. Gleichzeitig kann die Pathogenität der Antikörper, d.h. ihre Fähigkeit einen Adhäsionsverlust zwischen Keratinozyten zu induzieren, experimentell weiter untersucht werden. Hierfür bietet sich die etablierte Methode des Keratinozyten-Dissoziations-Assays an, die auf der Zugabe der Autoantikörper zu kultivierten humanen Keratinozyten basiert (Ishii et al., 2005). Diese Untersuchungen ermöglichen es, die Funktion der ebenfalls bei den gesunden Kontrollen in einer sehr niedrigen Frequenz vorkommenden autoreaktiven B-Zellen zu bestimmen, da hier vermutet werden kann, dass diese Zellen keine oder nur eine sehr geringe Pathogenität im Vergleich zu denen bei den Patienten aufweisen.

Trotz der vielfältigen neuen Erkenntnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden, konnten einige der sich aus den Beobachtungen ergebende Fragen mit der durchgeführten Querschnittsanalyse nicht abschließend beantwortet werden. Gerade die Kinetik einer möglichen IL-21-induzierten Autoantikörperinduktion blieb an einigen Stellen noch unverstanden. Eine weiterführende longitudinale Untersuchung bei der PV-Patienten beim Übergang von einer klinischen Remission hin zu einem Rezidiv und einer aktiven Erkrankung über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, bietet die Möglichkeit, die Frequenz und funktionelle Kapazität von autoreaktiven T-Zellen sowie die Entstehung von autoreaktiven B-Zell-Subpopulationen im zeitlichen Verlauf mit den oben beschriebenen gezielteren Untersuchungsmethoden besser nachzuvollziehen. Gerade der diskutierte zeitlich verzögerte Einfluss von IL-21 bzw. IL-21-produzierenden T-Zellen bei der Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen kann hierdurch aufgeklärt werden. Auch würde dies ermöglichen den postulierten Aktivierungsmechanismus von autoreaktiven Gedächtnis B-Zellen, der für die Entstehung eines klinischen Rezidivs mitverantwortlich sein könnte, experimentell zu überprüfen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen somit den Grundstein für weiterführende Untersuchungen, die zur Entwicklung von gegen IL-21 oder gegen autoreaktive B-Zellen gerichtete Therapieformen zur Behandlung des PV beitragen können.

6. Literaturverzeichnis

- Ahmed, A. R., Carrozzo, M., Caux, F., Cirillo, N., Dmochowski, M., Alonso, A. E., Gniadecki, R., Hertl, M., López-Zabalza, M. J., Lotti, R., Pincelli, C., Pittelkow, M., Schmidt, E., Sinha, A. A., Sprecher, E. und Grando, S. A.: 2016, Monopathogenic vs multipathogenic explanations of pemphigus pathophysiology, *Experimental Dermatology* **25**(11), 839–846.
- Ahmed, A. R., Kaveri, S. und Spigelman, Z.: 2015, Long-term remissions in recalcitrant pemphigus vulgaris, *New England Journal of Medicine* **373**(27), 2693–2694.
- Ahmed, A. R. und Shetty, S.: 2015, A comprehensive analysis of treatment outcomes in patients with pemphigus vulgaris treated with rituximab, *Autoimmunity reviews* **14**(4), 323–331.
- Ahmed, A. R., Wagner, R., Khatri, K., Notani, G., Awdeh, Z., Alper, C. A. und Yunis, E. J.: 1991, Major histocompatibility complex haplotypes and class ii genes in non-jewish patients with pemphigus vulgaris, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(11), 5056–5060.
- Ahmed, A. R., Yunis, E. J., Khatri, K., Wagner, R., Notani, G., Awdeh, Z. und Alper, C. A.: 1990, Major histocompatibility complex haplotype studies in ashkenazi jewish patients with pemphigus vulgaris, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(19), 7658–7662.
- Amagai, M.: 2002, Pemphigus as a paradigm of autoimmunity and cell adhesion, *The Keio journal of medicine* **51**(3), 133–139.
- Amagai, M., Hashimoto, T., Shimizu, N. und Nishikawa, T.: 1994, Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (dsg3) produced by baculovirus, *Journal of Clinical Investigation* **94**(1), 59–67.
- Amagai, M., Klaus-Kovtun, V. und Stanley, J. R.: 1991, Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion, *Cell* **67**(5), 869–877.
- Amber, K. T., Staropoli, P., Shiman, M. I., Elgart, G. W. und Hertl, M.: 2013, Autoreactive t cells in the immune pathogenesis of pemphigus vulgaris, *Experimental Dermatology* **22**(11), 699–704.
- Anhalt, G. J., Labib, R. S., Voorhees, J. J., Beals, T. F. und Diaz, L. A.: 1982, Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of igg from patients with the disease, *New England Journal of Medicine* **306**(20), 1189–1196.
- Ansel, K. M., McHeyzer-Williams, L. J., Ngo, V. N., McHeyzer-Williams, M. G. und Cyster, J. G.: 1999, In vivo-activated cd4 t cells upregulate cxc chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines, *The Journal of experimental medicine* **190**(8), 1123–1134.
- Arakawa, M., Dainichi, T., Yasumoto, S. und Hashimoto, T.: 2009, Lesional th17 cells in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus, *Journal of Dermatological Science* **53**(3), 228–231.

- Asothai, R., Anand, V., Das, D., Antil, P. S., Khandpur, S., Sharma, V. und Sharma, A.: 2015, Distinctive treg associated ccr4-ccl22 expression profile with altered frequency of th17/treg cell in the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, *Immunobiology* **220**(10), 1129–1135.
- Boonyaratanakornkit, J. und Taylor, J. J.: 2019, Techniques to study antigen-specific b cell responses, *Frontiers in Immunology* **10**, 1694.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M. und Förster, R.: 2000, Follicular b helper t cells express cxc chemokine receptor 5, localize to b cell follicles, and support immunoglobulin production, *The Journal of experimental medicine* **192**(11), 1545–1552.
- Bystryń, J.-C. und Rudolph, J. L.: 2005, Pemphigus, *Lancet (London, England)* **366**(9479), 61–73.
- Calkins, C. C., Setzer, S. V., Jennings, J. M., Summers, S., Tsunoda, K., Amagai, M. und Kowalczyk, A. P.: 2006, Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies, *Journal of Biological Chemistry* **281**(11), 7623–7634.
- Cambridge, G., Moura, R. A., Santos, T., Khawaja, A. A., Polido-Pereira, J., Canhão, H., Leandro, M. J. und Fonseca, J. E.: 2014, Expression of the inherently autoreactive idiotope 9g4 on autoantibodies to citrullinated peptides and on rheumatoid factors in patients with early and established rheumatoid arthritis, *PLoS ONE* **9**(9), e107513.
- Chen, D. M., Oduyungbo, A., Csinady, E., Gearhart, L., Lehane, P., Cheu, M., Maho-Vaillant, M., Prost-Squarcioni, C., Hebert, V., Houivet, E., Calbo, S., Caillot, F., Golinski, M. L., Labeille, B., Picard-Dahan, C., Paul, C., Richard, M. A., Bouaziz, J. D., Duvert-Lehembre, S., Bernard, P., Caux, F., Alexandre, M., Ingen-Housz-Oro, S., Vabres, P., Delaporte, E., Quereux, G., Dupuy, A., Debarbieux, S., Avenel-Audran, M., D'Incan, M., Bedane, C., Bénéton, N., Jullien, D., Dupin, N., Misery, L., Machet, L., Beylot-Barry, M., Dereure, O., Sassolas, B., Benichou, J., Musette, P. und Joly, P.: 2020, Rituximab is an effective treatment in patients with pemphigus vulgaris and demonstrates a steroid-sparing effect, *British Journal of Dermatology* **182**(5), 1111–1119.
- Chen, J., Zheng, Q., Hammers, C. M., Ellebrecht, C. T., Mukherjee, E. M., Tang, H.-Y., Lin, C., Yuan, H., Pan, M., Langenhan, J., Komorowski, L., Siegel, D. L., Payne, A. S. und Stanley, J. R.: 2017, Proteomic analysis of pemphigus autoantibodies indicates a larger, more diverse, and more dynamic repertoire than determined by b cell genetics, *Cell reports* **18**(1), 237–247.
- Cho, A., Caldara, A. L., Ran, N. A., Menne, Z., Kauffman, R. C., Affer, M., Llovet, A., Norwood, C., Scanlan, A., Mantus, G., Bradley, B., Zimmer, S., Schmidt, T., Hertl, M., Payne, A. S., Feldman, R., Kowalczyk, A. P. und Wrammert, J.: 2019, Single-cell analysis suggests that ongoing affinity maturation drives the emergence of pemphigus vulgaris autoimmune disease, *Cell reports* **28**(4), 909–922.e6.
- Cho, M. J., Ellebrecht, C. T. und Payne, A. S.: 2015, The dual nature of interleukin-10 in pemphigus vulgaris, *Cytokine* **73**(2), 335–341.

- Cho, M. J., Lo, A. S., Mao, X., Nagler, A. R., Ellebrecht, C. T., Mukherjee, E. M., Hammers, C. M., Choi, E.-J., Sharma, P. M., Uduman, M., Li, H., Rux, A. H., Farber, S. A., Rubin, C. B., Kleinstein, S. H., Sachais, B. S., Posner, M. R., Cavacini, L. A. und Payne, A. S.: 2014, Shared vh1-46 gene usage by pemphigus vulgaris autoantibodies indicates common humoral immune responses among patients, *Nature Communications* **5**, 2835.
- Choi, J.-Y., Ho, J. H.-e., Pasoto, S. G., Bunin, V., Kim, S. T., Carrasco, S., Borba, E. F., Gonçalves, C. R., Costa, P. R., Kallas, E. G., Bonfa, E. und Craft, J.: 2015, Circulating follicular helper-like t cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity, *Arthritis & Rheumatology* **67**(4), 988–999.
- Chtanova, T., Tangye, S. G., Newton, R., Frank, N., Hodge, M. R., Rolph, M. S. und Mackay, C. R.: 2004, T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-th1/th2 effector cells that provide help for b cells, *Journal of Immunology* **173**(1), 68–78.
- Colliou, N., Picard, D., Caillot, F., Calbo, S., Le Corre, S., Lim, A., Lemerrier, B., Le Mauff, B., Maho-Vaillant, M., Jacquot, S., Bedane, C., Bernard, P., Caux, F., Prost, C., Delaporte, E., Doutre, M.-S., Dreno, B., Franck, N., Ingen-Housz-Oro, S., Chosidow, O., Pauwels, C., Picard, C., Roujeau, J.-C., Sigal, M., Tancrede-Bohin, E., Templier, I., Eming, R., Hertl, M., D'Incan, M., Joly, P. und Musette, P.: 2013, Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein b cell response, *Science Translational Medicine* **5**(175), 175ra30–175ra30.
- Coquet, J. M., Kyparissoudis, K., Pellicci, D. G., Besra, G., Berzins, S. P., Smyth, M. J. und Godfrey, D. I.: 2007, IL-21 is produced by nkt cells and modulates nkt cell activation and cytokine production, *Journal of Immunology* **178**(5), 2827–2834.
- Crotty, S.: 2014, T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease, *Immunity* **41**(4), 529–542.
- Das, D., Akhtar, S., Kurra, S., Gupta, S. und Sharma, A.: 2019, Emerging role of immune cell network in autoimmune skin disorders: An update on pemphigus, vitiligo and psoriasis, *Cytokine & growth factor reviews* **45**, 35–44.
- Di Yu, Rao, S., Tsai, L. M., Lee, S. K., He, Y., Sutcliffe, E. L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., Ellyard, J. I., Parish, I. A., Ma, C. S., Li, Q.-J., Parish, C. R., Mackay, C. R. und Vinuesa, C. G.: 2009, The transcriptional repressor bcl-6 directs t follicular helper cell lineage commitment, *Immunity* **31**(3), 457–468.
- Di Zenzo, G., Amber, K. T., Sayar, B. S., Müller, E. J. und Borradori, L.: 2016, Immune response in pemphigus and beyond: progresses and emerging concepts, *Seminars in Immunopathology* **38**(1), 57–74.
- Di Zenzo, G., Di Lullo, G., Corti, D., Calabresi, V., Sinistro, A., Vanzetta, F., Didona, B., Cianchini, G., Hertl, M., Eming, R., Amagai, M., Ohshima, B., Hashimoto, T., Sloostra, J., Salustio, F., Zambruno, G. und Lanzavecchia, A.: 2012, Pemphigus autoantibodies generated

- through somatic mutations target the desmoglein-3 cis-interface, *Journal of Clinical Investigation* **122**(10), 3781–3790.
- Didona, D., Maglie, R., Eming, R. und Hertl, M.: 2019, Pemphigus: Current and future therapeutic strategies, *Frontiers in Immunology* **10**, 1418.
- Dinesh, P. und Rasool, M.: 2018, Multifaceted role of il-21 in rheumatoid arthritis: Current understanding and future perspectives, *Journal of cellular physiology* **233**(5), 3918–3928.
- Dorfman, D. M., Brown, J. A., Shahsafaei, A. und Freeman, G. J.: 2006, Programmed death-1 (pd-1) is a marker of germinal center-associated t cells and angioimmunoblastic t-cell lymphoma, *The American journal of surgical pathology* **30**(7), 802–810.
- Ellebrecht, C. T., Bhoj, V. G., Nace, A., Choi, E. J., Mao, X., Cho, M. J., Di Zenzo, G., Lanza-vecchia, A., Seykora, J. T., Cotsarelis, G., Milone, M. C. und Payne, A. S.: 2016, Reengineering chimeric antigen receptor t cells for targeted therapy of autoimmune disease, *Science* **353**(6295), 179–184.
- Ellebrecht, C. T., Lundgren, D. K. und Payne, A. S.: 2019, On the mark: genetically engineered immunotherapies for autoimmunity, *Current opinion in immunology* **61**, 69–73.
- Eming, R.: 2015, Pemphigus. Modellerkrankung für zielgerichtete Therapien, *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **66**(8), 574–582.
- Eming, R., Hennerici, T., Bäcklund, J., Feliciani, C., Visconti, K. C., Willenborg, S., Wohde, J., Holmdahl, R., Sønderstrup, G. und Hertl, M.: 2014, Pathogenic igg antibodies against desmoglein 3 in pemphigus vulgaris are regulated by hla-drβ1*04:02–restricted t cells, *The Journal of Immunology* **193**(9), 4391–4399.
- Eming, R. und Hertl, M.: 2006, Immunoabsorption in pemphigus, *Autoimmunity* **39**(7), 609–616.
- Eming, R., Nagel, A., Wolff-Franke, S., Podstawa, E., Debus, D. und Hertl, M.: 2008, Rituximab exerts a dual effect in pemphigus vulgaris, *Journal of Investigative Dermatology* **128**(12), 2850–2858.
- Eming, R., Rech, J., Barth, S., Kalden, J. R., Schuler, G., Harrer, T. und Hertl, M.: 2006, Prolonged clinical remission of patients with severe pemphigus upon rapid removal of desmoglein-reactive autoantibodies by immunoabsorption, *Dermatology* **212**(2), 177–187.
- Ettinger, R., Sims, G. P., Fairhurst, A.-M., Robbins, R., da Silva, Y. S., Spolski, R., Leonard, W. J. und Lipsky, P. E.: 2005, Il-21 induces differentiation of human naive and memory b cells into antibody-secreting plasma cells, *Journal of Immunology* **175**(12), 7867–7879.
- European Medicines Agency: 2019, Summary of opinion: Mabthera rituximab.
- Frölich, D., Giesecke, C., Mei, H. E., Reiter, K., Daridon, C., Lipsky, P. E. und Dörner, T.: 2010, Secondary immunization generates clonally related antigen-specific plasma cells and memory b cells, *Journal of Immunology* **185**(5), 3103–3110.

- Futei, Y., Amagai, M., Ishii, K., Kuroda-Kinoshita, K., Ohya, K. und Nishikawa, T.: 2001, Pre-dominant igg4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus, *Journal of Dermatological Science* **26**(1), 55–61.
- Gatto, M., Wiedemann, A., Nomovi, N., Reiter, K., Schrezenmeier, E., Rose, T., Szelinski, F., Lino, A. C., Valentino, S., Ghirardello, A., Dörner, T. und Doria, A.: 2019, Circulating pentraxin3-specific b cells are decreased in lupus nephritis, *Frontiers in Immunology* **10**, 29.
- Gensous, N., Charrier, M., Duluc, D., Contin-Bordes, C., Truchetet, M.-E., Lazaro, E., Duffau, P., Blanco, P. und Richez, C.: 2018, T follicular helper cells in autoimmune disorders, *Frontiers in Immunology* **9**, 1637.
- Gies, V., Wagner, A., Seifert, C., Guffroy, A., Fauny, J.-D., Knapp, A.-M., Pasquali, J.-L., Martin, T., Dumortier, H., Korganow, A.-S. und Soulas-Sprauel, P.: 2017, Identification of autoreactive b cells with labeled nucleosomes, *Scientific reports* **7**(1), 602.
- Gilman, M. S. A., Castellanos, C. A., Chen, M., Ngwuta, J. O., Goodwin, E., Moin, S. M., Mas, V., Melero, J. A., Wright, P. F., Graham, B. S., McLellan, J. S. und Walker, L. M.: 2016, Rapid profiling of rsv antibody repertoires from the memory b cells of naturally infected adult donors, *Science immunology* **1**(6).
- Giltiay, N. V., Chappell, C. P. und Clark, E. A.: 2012, B-cell selection and the development of autoantibodies, *Arthritis research & therapy* **14 Suppl 4**, S1.
- Giordano, C. N. und Sinha, A. A.: 2012, Cytokine networks in pemphigus vulgaris: An integrated viewpoint, *Autoimmunity* **45**(6), 427–439.
- Good-Jacobson, K. L., Szumilas, C. G., Chen, L., Sharpe, A. H., Tomayko, M. M. und Shlomchik, M. J.: 2010, Pd-1 regulates germinal center b cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells, *Nature immunology* **11**(6), 535–542.
- Grimbacher, B., Hutloff, A., Schlesier, M., Glocker, E., Warnatz, K., Dräger, R., Eibel, H., Fischer, B., Schäffer, A. A., Mages, H. W., Kroczeck, R. A. und Peter, H. H.: 2003, Homozygous loss of icos is associated with adult-onset common variable immunodeficiency, *Nature immunology* **4**(3), 261–268.
- Hale, M., Rawlings, D. J. und Jackson, S. W.: 2018, The long and the short of it: insights into the cellular source of autoantibodies as revealed by b cell depletion therapy, *Current opinion in immunology* **55**, 81–88.
- Hall, R. P., Fairley, J., Woodley, D., Werth, V. P., Hannah, D., Streilein, R. D., McKillip, J., Okawa, J., Rose, M., Keyes-Elstein, L. L., Pinckney, A., Overington, A., Wedgwood, J., Ding, L. und Welch, B.: 2015, A multicentre randomized trial of the treatment of patients with pemphigus vulgaris with infliximab and prednisone compared with prednisone alone, *British Journal of Dermatology* **172**(3), 760–768.
- Hammers, C. M., Chen, J., Lin, C., Kacir, S., Siegel, D. L., Payne, A. S. und Stanley, J. R.: 2015, Persistence of anti-desmoglein 3 igg + b-cell clones in pemphigus patients over years, *Journal of Investigative Dermatology* **135**(3), 742–749.

- Hammers, C. M. und Stanley, J. R.: 2016, Mechanisms of disease: Pemphigus and bullous pemphigoid, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **11**(1), 175–197.
- Harman, K. E., Seed, P. T., Gratian, M. J., Bhogal, B. S., Challacombe, S. J. und Black, M. M.: 2001, The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels, *British Journal of Dermatology* **144**(4), 775–780.
- He, J., Tsai, L. M., Leong, Y. A., Hu, X., Ma, C. S., Chevalier, N., Sun, X., Vandenberg, K., Rockman, S., Ding, Y., Zhu, L., Wei, W., Wang, C., Karnowski, A., Belz, G. T., Ghali, J. R., Cook, M. C., Riminton, D. S., Veillette, A., Schwartzberg, P. L., Mackay, F., Brink, R., Tangye, S. G., Vinuesa, C. G., Mackay, C. R., Li, Z. und Di Yu: 2013, Circulating precursor ccr7(lo)pd-1(hi) cxc5⁺ cd4⁺ t cells indicate tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure, *Immunity* **39**(4), 770–781.
- Hebert, V. und Joly, P.: 2018, Rituximab in pemphigus, *Immunotherapy* **10**(1), 27–37.
- Hertl, M. und Veldman, C.: 2001, Pemphigus—paradigm of autoantibody-mediated autoimmunity, *Skin pharmacology and applied skin physiology* **14**(6), 408–418.
- Heupel, W.-M., Zillikens, D., Drenckhahn, D. und Waschke, J.: 2008, Pemphigus vulgaris igg directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction, *The Journal of Immunology* **181**(3), 1825–1834.
- Hiepe, F., Dörner, T., Hauser, A. E., Hoyer, B. F., Mei, H. und Radbruch, A.: 2011, Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation, *Nature reviews. Rheumatology* **7**(3), 170–178.
- Hiepe, F. und Radbruch, A.: 2016, Plasma cells as an innovative target in autoimmune disease with renal manifestations, *Nature Reviews Nephrology* **12**(4), 232–240.
- Hoyer, B. F. und Radbruch, A.: 2017, Protective and pathogenic memory plasma cells, *Immunology letters* **189**, 10–12.
- Huang, S., Mao, J., Zhou, L., Xiong, X. und Deng, Y.: 2019, The imbalance of gut microbiota and its correlation with plasma inflammatory cytokines in pemphigus vulgaris patients, *Scandinavian journal of immunology* **90**(3), e12799.
- Irani, V., Guy, A. J., Andrew, D., Beeson, J. G., Ramsland, P. A. und Richards, J. S.: 2015, Molecular properties of human igg subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases, *Molecular immunology* **67**(2 Pt A), 171–182.
- Ishii, K., Harada, R., Matsuo, I., Shirakata, Y., Hashimoto, K. und Amagai, M.: 2005, In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 igg autoantibodies in pemphigus vulgaris, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **124**(5), 939–946.

- Jacobi, A. M., Zhang, J., Mackay, M., Aranow, C. und Diamond, B.: 2009, Phenotypic characterization of autoreactive b cells—checkpoints of b cell tolerance in patients with systemic lupus erythematosus, *PLoS ONE* **4**(6), e5776.
- James, K. A., Culton, D. A. und Diaz, L. A.: 2011, Diagnosis and clinical features of pemphigus foliaceus, *Dermatologic clinics* **29**(3), 405–12, viii.
- Joly, P., Maho-Vaillant, M., Prost-Squarcioni, C., Hebert, V., Houivet, E., Calbo, S., Caillot, F., Golinski, M. L., Labeille, B., Picard-Dahan, C., Paul, C., Richard, M.-A., Bouaziz, J. D., Duvert-Lehembre, S., Bernard, P., Caux, F., Alexandre, M., Ingen-Housz-Oro, S., Vabres, P., Delaporte, E., Quereux, G., Dupuy, A., Debarbieux, S., Avenel-Audran, M., D'Incan, M., Bedane, C., Bénétou, N., Jullien, D., Dupin, N., Misery, L., Machet, L., Beylot-Barry, M., Dereure, O., Sassolas, B., Vermeulin, T., Benichou, J. und Musette, P.: 2017, First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial, *The Lancet* **389**(10083), 2031–2040.
- Joly, P., Mouquet, H., Roujeau, J.-C., D'Incan, M., Gilbert, D., Jacquot, S., Gougeon, M.-L., Bedane, C., Muller, R., Dreno, B., Doutre, M.-S., Delaporte, E., Pauwels, C., Franck, N., Caux, F., Picard, C., Tancrede-Bohin, E., Bernard, P., Tron, F., Hertl, M. und Musette, P.: 2007, A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus, *New England Journal of Medicine* **357**(6), 545–552.
- Jones, C. C., Hamilton, R. G. und Jordon, R. E.: 1988, Subclass distribution of human igh autoantibodies in pemphigus, *Journal of clinical immunology* **8**(1), 43–49.
- June, C. H., O'Connor, R. S., Kawalekar, O. U., Ghassemi, S. und Milone, M. C.: 2018, Car t cell immunotherapy for human cancer, *Science* **359**(6382), 1361–1365.
- Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T., Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., Ohara, O., Rajewsky, K. und Takemori, T.: 2012, Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory, *The Journal of experimental medicine* **209**(11), 2079–2097.
- Kasperkiewicz, M., Ellebrecht, C. T., Takahashi, H., Yamagami, J., Zillikens, D., Payne, A. S. und Amagai, M.: 2017, Pemphigus, *Nature Reviews Disease Primers* **3**, 17026.
- Kasperkiewicz, M., Eming, R., Behzad, M., Hunzelmann, N., Meurer, M., Schulze-Koops, H., von Wussow, P., Hertl, M., Zillikens, D., Freivogel, K., Dörner, T. und Schmidt, E.: 2012, Efficacy and safety of rituximab in pemphigus: experience of the german registry of autoimmune diseases, *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **10**(10), 727–731.
- Keskin, D. B., Stern, J. N. H., Fridkis-Hareli, M. und Razzaque Ahmed, A.: 2008, Cytokine profiles in pemphigus vulgaris patients treated with intravenous immunoglobulins as compared to conventional immunosuppressive therapy, *Cytokine* **41**(3), 315–321.
- Kim, A. R., Han, D., Choi, J. Y., Seok, J., Kim, S.-E., Seo, S.-H., Takahashi, H., Amagai, M., Park, S.-H., Kim, S.-C., Shin, E.-C. und Kim, J. H.: 2020, Targeting icos expressed on cxcr5+pd-1+

- t helper cells suppresses the progression of pemphigus vulgaris, *The Journal of allergy and clinical immunology* p. [Epub ahead of print].
- Kim, C. H., Rott, L. S., Clark-Lewis, I., Campbell, D. J., Wu, L. und Butcher, E. C.: 2001, Subspecialization of cxcr5+ t cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of cxcr5+ t cells, *The Journal of experimental medicine* **193**(12), 1373–1381.
- Kim, S. J., Lee, K. und Diamond, B.: 2018, Follicular helper t cells in systemic lupus erythematosus, *Frontiers in Immunology* **9**, 1793.
- Kneisel, A. und Hertl, M.: 2011a, Autoimmune bullous skin diseases. part 1: Clinical manifestations, *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **9**(10), 844–857.
- Kneisel, A. und Hertl, M.: 2011b, Autoimmune bullous skin diseases. part 2: diagnosis and therapy, *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **9**(11), 927–947.
- Koch, P. J., Mahoney, M. G., Ishikawa, H., Pulkkinen, L., Uitto, J., Shultz, L., Murphy, G. F., Whitaker-Menezes, D. und Stanley, J. R.: 1997, Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris, *The Journal of cell biology* **137**(5), 1091–1102.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T. B., Oukka, M. und Kuchroo, V. K.: 2007, Il-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory t(h)17 cells, *Nature* **448**(7152), 484–487.
- Koulu, L., Kusumi, A., Steinberg, M. S., Klaus-Kovtun, V. und Stanley, J. R.: 1984, Human autoantibodies against a desmosomal core protein in pemphigus foliaceus, *The Journal of experimental medicine* **160**(5), 1509–1518.
- Kowalski, E. H., Kneibner, D., Kridin, K. und Amber, K. T.: 2019, Serum and blister fluid levels of cytokines and chemokines in pemphigus and bullous pemphigoid, *Autoimmunity reviews* **18**(5), 526–534.
- Kuchen, S., Robbins, R., Sims, G. P., Sheng, C., Phillips, T. M., Lipsky, P. E. und Ettinger, R.: 2007, Essential role of il-21 in b cell activation, expansion, and plasma cell generation during cd4+ t cell-b cell collaboration, *Journal of Immunology* **179**(9), 5886–5896.
- Kurosaki, T., Kometani, K. und Ise, W.: 2015, Memory b cells, *Nature reviews. Immunology* **15**(3), 149–159.
- Le Coz, C., Joublin, A., Pasquali, J.-L., Korganow, A.-S., Dumortier, H. und Monneaux, F.: 2013, Circulating tfh subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease, *PLoS ONE* **8**(9), e75319.
- Lee, E., Lendas, K. A., Chow, S., Pirani, Y., Gordon, D., Dionisio, R., Nguyen, D., Spizuoco, A., Fotino, M., Zhang, Y. und Sinha, A. A.: 2006, Disease relevant hla class ii alleles isolated by genotypic, haplotypic, and sequence analysis in north american caucasians with pemphigus vulgaris, *Human Immunology* **67**(1-2), 125–139.

- Lee, S. H., Hong, W. J. und Kim, S.-C.: 2017, Analysis of serum cytokine profile in pemphigus, *Annals of dermatology* **29**(4), 438–445.
- Lenz, P., Amagai, M., Volc-Platzer, B., Stingl, G. und Kirnbauer, R.: 1999, Desmoglein 3-elisa: a pemphigus vulgaris-specific diagnostic tool, *Archives of Dermatology* **135**(2), 143–148.
- Li, Q., Liu, Z., Dang, E., Jin, L., He, Z., Yang, L., Shi, X. und Wang, G.: 2013, Follicular helper t cells (tfh) and il-21 involvement in the pathogenesis of bullous pemphigoid, *PLoS ONE* **8**(7), e68145.
- Liu, R., Wu, Q., Su, D., Che, N., Chen, H., Geng, L., Chen, J., Chen, W., Li, X. und Sun, L.: 2012, A regulatory effect of il-21 on t follicular helper-like cell and b cell in rheumatoid arthritis, *Arthritis research & therapy* **14**(6), R255.
- Lobo, P. I.: 2016, Role of natural autoantibodies and natural igm anti-leucocyte autoantibodies in health and disease, *Frontiers in Immunology* **7**, 198.
- Lunardon, L., Tsai, K. J., Propert, K. J., Fett, N., Stanley, J. R., Werth, V. P., Tsai, D. E. und Payne, A. S.: 2012, Adjuvant rituximab therapy of pemphigus: a single-center experience with 31 patients, *Archives of dermatology* **148**(9), 1031–1036.
- Luo, C., Li, Y., Liu, W., Feng, H., Wang, H., Huang, X., Qiu, L. und Ouyang, J.: 2013, Expansion of circulating counterparts of follicular helper t cells in patients with myasthenia gravis, *Journal of neuroimmunology* **256**(1-2), 55–61.
- Lüthje, K., Kallies, A., Shimohakamada, Y., Belz, G. T., Light, A., Tarlinton, D. M. und Nutt, S. L.: 2012, The development and fate of follicular helper t cells defined by an il-21 reporter mouse, *Nature immunology* **13**(5), 491–498.
- Ma, C. S., Deenick, E. K., Batten, M. und Tangye, S. G.: 2012, The origins, function, and regulation of t follicular helper cells, *The Journal of experimental medicine* **209**(7), 1241–1253.
- Mahoney, M. G., Wang, Z., Rothenberger, K., Koch, P. J., Amagai, M. und Stanley, J. R.: 1999, Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris, *Journal of Clinical Investigation* **103**(4), 461–468.
- Mannoor, K., Matejuk, A., Xu, Y., Beardall, M. und Chen, C.: 2012, Expression of natural autoantibodies in mrl-lpr mice protects from lupus nephritis and improves survival, *Journal of Immunology* **188**(8), 3628–3638.
- Maynard, C. L., Harrington, L. E., Janowski, K. M., Oliver, J. R., Zindl, C. L., Rudensky, A. Y. und Weaver, C. T.: 2007, Regulatory t cells expressing interleukin 10 develop from foxp3+ and foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10, *Nature immunology* **8**(9), 931–941.
- Meffre, E. und O'Connor, K. C.: 2019, Impaired b-cell tolerance checkpoints promote the development of autoimmune diseases and pathogenic autoantibodies, *Immunological reviews* **292**(1), 90–101.

- Mignard, C., Maho-Vaillant, M., Golinski, M.-L., Balayé, P., Prost-Squarcioni, C., Houivet, E., Calbo, S. B., Labeille, B., Picard-Dahan, C., Konstantinou, M. P., Chaby, G., Richard, M.-A., Bouaziz, J.-D., Duvert-Lehembre, S., Delaporte, E., Bernard, P., Caux, F., Alexandre, M., Ingen-Housz-Oro, S., Vabres, P., Quereux, G., Dupuy, A., Debarbieux, S., Avenel-Audran, M., D'Incan, M., Bédane, C., Bénéton, N., Jullien, D., Dupin, N., Misery, L., Machet, L., Beylot-Barry, M., Dereure, O., Sassolas, B., Benichou, J., Joly, P. und Hébert, V.: 2020, Factors associated with short-term relapse in patients with pemphigus who receive rituximab as first-line therapy: A post hoc analysis of a randomized clinical trial, *JAMA dermatology* p. [Epub ahead of print].
- Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., Lavecchio, E. M., Punaro, M., Pascual, V., Banchereau, J. und Ueno, H.: 2011, Human blood cxc5(+)/cd4(+) t cells are counterparts of t follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion, *Immunity* **34**(1), 108–121.
- Mouquet, H., Musette, P., Gougeon, M.-L., Jacquot, S., Lemerrier, B., Lim, A., Gilbert, D., Dutot, I., Roujeau, J. C., D'Incan, M., Bedane, C., Tron, F. und Joly, P.: 2008, B-cell depletion immunotherapy in pemphigus: effects on cellular and humoral immune responses, *The Journal of investigative dermatology* **128**(12), 2859–2869.
- Müller, R., Dahler, C., Möbs, C., Wenzel, E., Eming, R., Messer, G., Niedermeier, A. und Hertl, M.: 2010, T and b cells target identical regions of the non-collagenous domain 1 of type vii collagen in epidermolysis bullosa acquisita, *Clinical Immunology* **135**(1), 99–107.
- Müller, R., Svoboda, V., Wenzel, E., Gebert, S., Hunzelmann, N., Muller, H.-H. und Hertl, M.: 2006, Igg reactivity against non-conformational nh2-terminal epitopes of the desmoglein 3 ectodomain relates to clinical activity and phenotype of pemphigus vulgaris, *Experimental Dermatology* **15**(8), 606–614.
- Murrell, D. F., Dick, S., Ahmed, A. R., Amagai, M., Barnadas, M. A., Borradori, L., Bystryin, J.-C., Cianchini, G., Diaz, L., Fivenson, D., Hall, R., Harman, K. E., Hashimoto, T., Hertl, M., Hunzelmann, N., Iranzo, P., Joly, P., Jonkman, M. F., Kitajima, Y., Korman, N. J., Martin, L. K., Mimouni, D., Pandya, A. G., Payne, A. S., Rubenstein, D., Shimizu, H., Sinha, A. A., Sirois, D., Zillikens, D. und Werth, V. P.: 2008, Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus, *Journal of the American Academy of Dermatology* **58**(6), 1043–1046.
- Murrell, D. F., Peña, S., Joly, P., Marinovic, B., Hashimoto, T., Diaz, L. A., Sinha, A. A., Payne, A. S., Daneshpazhooh, M., Eming, R., Jonkman, M. F., Mimouni, D., Borradori, L., Kim, S.-C., Yamagami, J., Lehman, J. S., Saleh, M. A., Culton, D. A., Czernik, A., Zone, J. J., Fivenson, D., Ujiie, H., Wozniak, K., Akman-Karakaş, A., Bernard, P., Korman, N. J., Caux, F., Drenovska, K., Prost-Squarcioni, C., Vassileva, S., Feldman, R. J., Cardones, A. R., Bauer, J., Ioannides, D., Jedlickova, H., Palisson, F., Patsatsi, A., Uzun, S., Yayli, S., Zillikens, D., Amagai, M., Hertl, M., Schmidt, E., Aoki, V., Grando, S. A., Shimizu, H., Baum, S., Cianchini, G., Feliciani, C.,

- Iranzo, P., Mascaró, J. M., Kowalewski, C., Hall, R., Groves, R., Harman, K. E., Marinkovich, M. P., Maverakis, E. und Werth, V. P.: 2020, Diagnosis and management of pemphigus: Recommendations of an international panel of experts, *Journal of the American Academy of Dermatology* **82**(3), 575–585.e1.
- Nei, T., Urano, S., Motoi, N., Hashimoto, A., Kitamura, N., Tanaka, T., Nakagaki, K., Takizawa, J., Kaneko, C., Tazawa, R. und Nakata, K.: 2019, Memory b cell pool of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis patients contains higher frequency of gm-csf autoreactive b cells than healthy subjects, *Immunology letters* **212**, 22–29.
- Nemazee, D.: 2017, Mechanisms of central tolerance for b cells, *Nature reviews. Immunology* **17**(5), 281–294.
- Nguyen, V. T., Ndoeye, A., Shultz, L. D., Pittelkow, M. R. und Grando, S. A.: 2000, Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris–like lesions, *Journal of Clinical Investigation* **106**(12), 1467–1479.
- Nishifuji, K., Amagai, M., Kuwana, M., Iwasaki, T. und Nishikawa, T.: 2000, Detection of antigen-specific b cells in patients with pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay: requirement of t cell collaboration for autoantibody production, *The Journal of investigative dermatology* **114**(1), 88–94.
- Nomura, H. und Amagai, M.: 2020, Is local production of autoantibodies in skin lesions relevant in pemphigus?, *The Journal of investigative dermatology* **140**(2), 275–276.
- Nurieva, R. I., Chung, Y., Martinez, G. J., Yang, X. O., Tanaka, S., Matskevitch, T. D., Wang, Y.-H. und Dong, C.: 2009, Bcl6 mediates the development of t follicular helper cells, *Science* **325**(5943), 1001–1005.
- Nurieva, R., Yang, X. O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A. D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S. S., Jetten, A. M. und Dong, C.: 2007, Essential autocrine regulation by il-21 in the generation of inflammatory t cells, *Nature* **448**(7152), 480–483.
- Odendahl, M., Mei, H., Hoyer, B. F., Jacobi, A. M., Hansen, A., Muehlinghaus, G., Berek, C., Hiepe, F., Manz, R., Radbruch, A. und Dörner, T.: 2005, Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response, *Blood* **105**(4), 1614–1621.
- Oyama, Y., Parker, E. R., Brieva, J., Guitart, J., Statkute, L., Verda, L. und Burt, R. K.: 2004, High-dose immune suppression and autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory pemphigus foliaceus, *Bone marrow transplantation* **34**(12), 1097–1098.
- Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.-P., Wang, G., Qi, C.-F., Hwu, P., Shaffer, D. J., Akilesh, S., Roopenian, D. C., Morse, H. C., Lipsky, P. E. und Leonard, W. J.: 2004, Regulation of b cell differentiation and plasma cell generation by il-21, a novel inducer of blimp-1 and bcl-6, *Journal of Immunology* **173**(9), 5361–5371.

- Panneton, V., Chang, J., Witalis, M., Li, J. und Suh, W.-K.: 2019, Inducible t-cell co-stimulator: Signaling mechanisms in t follicular helper cells and beyond, *Immunological reviews* **291**(1), 91–103.
- Patel, D. D. und Kuchroo, V. K.: 2015, Th17 cell pathway in human immunity: Lessons from genetics and therapeutic interventions, *Immunity* **43**(6), 1040–1051.
- Payne, A. S., Ishii, K., Kacir, S., Lin, C., Li, H., Hanakawa, Y., Tsunoda, K., Amagai, M., Stanley, J. R. und Siegel, D. L.: 2005, Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display, *Journal of Clinical Investigation* **115**(4), 888–899.
- Pelzek, A. J., Grönwall, C., Rosenthal, P., Greenberg, J. D., McGeachy, M., Moreland, L., Rigby, W. F. C. und Silverman, G. J.: 2017, Persistence of disease-associated anti-citrullinated protein antibody-expressing memory b cells in rheumatoid arthritis in clinical remission, *Arthritis & Rheumatology* **69**(6), 1176–1186.
- Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W. G., Caraux, A., Schmitz, A., Almeida, J., Vogt, R. F., Marti, G. E., Rawstron, A. C., van Zelm, M. C., van Dongen, J. J. M., Johnsen, H. E., Klein, B. und Orfao, A.: 2010, Human peripheral blood b-cell compartments: a crossroad in b-cell traffic, *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* **78 Suppl 1**, S47–60.
- Pollmann, R., Schmidt, T., Eming, R. und Hertl, M.: 2018, Pemphigus: a comprehensive review on pathogenesis, clinical presentation and novel therapeutic approaches, *Clinical reviews in allergy & immunology* **54**(1), 1–25.
- Prüßmann, W., Prüßmann, J., Koga, H., Recke, A., Iwata, H., Juhl, D., Görg, S., Henschler, R., Hashimoto, T., Schmidt, E., Zillikens, D., Ibrahim, S. M. und Ludwig, R. J.: 2015, Prevalence of pemphigus and pemphigoid autoantibodies in the general population, *Orphanet journal of rare diseases* **10**, 63.
- Rafei, D., Müller, R., Ishii, N., Llamazares, M., Hashimoto, T., Hertl, M. und Eming, R.: 2011, IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion, *The American Journal of Pathology* **178**(2), 718–723.
- Ran, N. A. und Payne, A. S.: 2017, Rituximab therapy in pemphigus and other autoantibody-mediated diseases, *F1000Research* **6**, 83.
- Rao, D. A., Gurish, M. F., Marshall, J. L., Slowikowski, K., Fonseka, C. Y., Liu, Y., Donlin, L. T., Henderson, L. A., Wei, K., Mizoguchi, F., Teslovich, N. C., Weinblatt, M. E., Massarotti, E. M., Coblyn, J. S., Helfgott, S. M., Lee, Y. C., Todd, D. J., Bykerk, V. P., Goodman, S. M., Pernis, A. B., Ivashkiv, L. B., Karlson, E. W., Nigrovic, P. A., Filer, A., Buckley, C. D., Lederer, J. A., Raychaudhuri, S. und Brenner, M. B.: 2017, Pathologically expanded peripheral t helper cell subset drives b cells in rheumatoid arthritis, *Nature* **542**(7639), 110–114.
- Rasmussen, T. K., Andersen, T., Hvid, M., Hetland, M. L., Hørslev-Petersen, K., Stengaard-Pedersen, K., Holm, C. K. und Deleuran, B.: 2010, Increased interleukin 21 (il-21) and il-23

- are associated with increased disease activity and with radiographic status in patients with early rheumatoid arthritis, *The Journal of rheumatology* **37**(10), 2014–2020.
- Ricard, L., Jachiet, V., Malard, F., Ye, Y., Stocker, N., Rivière, S., Senet, P., Monfort, J.-B., Fain, O., Mohty, M., Gaugler, B. und Mekinian, A.: 2019, Circulating follicular helper t cells are increased in systemic sclerosis and promote plasmablast differentiation through the il-21 pathway which can be inhibited by ruxolitinib, *Annals of the rheumatic diseases* **78**(4), 539–550.
- Rizzo, C., Fotino, M., Zhang, Y., Chow, S., Spizuoco, A. und Sinha, A. A.: 2005, Direct characterization of human t cells in pemphigus vulgaris reveals elevated autoantigen-specific th2 activity in association with active disease, *Clinical and experimental dermatology* **30**(5), 535–540.
- Rowley, T.: 2012, Flow cytometry - a survey and the basics, *Materials and Methods* **2**, 125.
- Ryu, J.-G., Lee, J., Kim, E.-K., Seo, H.-B., Park, J.-S., Lee, S.-Y., Moon, Y.-M., Yoo, S.-H., Park, Y.-w., Park, S.-H., Cho, M.-L. und Kim, H.-Y.: 2015, Treatment of il-21r-fc control autoimmune arthritis via suppression of stat3 signal pathway mediated regulation of the th17/treg balance and plasma b cells, *Immunology letters* **163**(2), 143–150.
- Sárdy, M. und Kasperkiewicz, M.: 2013, Bullöse Autoimmunkrankheiten bei Kindern, *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **64**(6), 447–455.
- Satyam, A., Khandpur, S., Sharma, V. K. und Sharma, A.: 2009, Involvement of t(h)1/t(h)2 cytokines in the pathogenesis of autoimmune skin disease-pemphigus vulgaris, *Immunological investigations* **38**(6), 498–509.
- Schmitt, N., Bentebibel, S.-E. und Ueno, H.: 2014, Phenotype and functions of memory tfh cells in human blood, *Trends in immunology* **35**(9), 436–442.
- Scorer, M., Setterfield, J. F. und Harman, K. E.: 2020, Rituximab with prednisolone as first-line treatment in pemphigus vulgaris, *British Journal of Dermatology* **182**(5), 1078–1079.
- Simpson, N., Gatenby, P. A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D. A., Tangye, S. G., Manku, H., Vyse, T. J., Roncador, G., Huttley, G. A., Goodnow, C. C., Vinuesa, C. G. und Cook, M. C.: 2010, Expansion of circulating t cells resembling follicular helper t cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus, *Arthritis & Rheumatism* **62**(1), 234–244.
- Sinha, A. A. und Sajda, T.: 2018, The evolving story of autoantibodies in pemphigus vulgaris: Development of the super compensation hypothesis, *Frontiers in medicine* **5**, 218.
- Spaeth, S., Riechers, R., Borradori, L., Zillikens, D., Büdinger, L. und Hertl, M.: 2001, Igg, iga und ige autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris, *British Journal of Dermatology* **144**(6), 1183–1188.
- Spolski, R. und Leonard, W. J.: 2008, Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity, *Annual review of immunology* **26**, 57–79.

- Spolski, R. und Leonard, W. J.: 2010, IL-21 and T follicular helper cells, *International Immunology* **22**(1), 7–12.
- Spolski, R. und Leonard, W. J.: 2014, Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential, *Nature reviews. Drug discovery* **13**(5), 379–395.
- Stockinger, B. und Omenetti, S.: 2017, The dichotomous nature of T helper 17 cells, *Nature reviews. Immunology* **17**(9), 535–544.
- Svecova, D., Parnicka, Z., Pastyrkova, L., Urbancek, S., Luha, J. und Buc, M.: 2015, HLA-DRB1* and DQB1* alleles are associated with disease severity in patients with pemphigus vulgaris, *International Journal of Dermatology* **54**(2), 168–173.
- Takahashi, H., Amagai, M., Nishikawa, T., Fujii, Y., Kawakami, Y. und Kuwana, M.: 2008, Novel system evaluating in vivo pathogenicity of desmoglein 3-reactive T cell clones using murine pemphigus vulgaris, *The Journal of Immunology* **181**(2), 1526–1535.
- Takahashi, H., Kuwana, M. und Amagai, M.: 2009, A single helper T cell clone is sufficient to commit polyclonal naive B cells to produce pathogenic IgG in experimental pemphigus vulgaris, *Journal of Immunology* **182**(3), 1740–1745.
- Tangye, S. G., Ma, C. S., Brink, R. und Deenick, E. K.: 2013, The good, the bad and the ugly - Tfh cells in human health and disease, *Nature Reviews Immunology* **13**(6), 412–426.
- Tavakolpour, S.: 2016, Interleukin 21 as a new possible player in pemphigus: Is it a suitable target?, *International immunopharmacology* **34**, 139–145.
- Tavakolpour, S.: 2018, Pemphigus trigger factors: special focus on pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus, *Archives of dermatological research* **310**(2), 95–106.
- Tavakolpour, S., Mahmoudi, H., Mirzazadeh, A., Balighi, K., Darabi-Monadi, S., Hatami, S., Ghasemi-Adl, M. und Daneshpazhooh, M.: 2020, Pathogenic and protective roles of cytokines in pemphigus: A systematic review, *Cytokine* **129**, 155026.
- Taylor, J. J., Pape, K. A. und Jenkins, M. K.: 2012, A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response, *The Journal of experimental medicine* **209**(3), 597–606.
- Timoteo, R. P., da Silva, M. V., Miguel, C. B., Silva, D. A. A., Catarino, J. D. S., Rodrigues Junior, V., Sales-Campos, H. und Freire Oliveira, C. J.: 2017, Th1/Th17-related cytokines and chemokines and their implications in the pathogenesis of pemphigus vulgaris, *Mediators of Inflammation* **2017**(4), 1–9.
- Tong, J. C., Tan, T. W., Sinha, A. A. und Ranganathan, S.: 2006, Prediction of desmoglein-3 peptides reveals multiple shared T-cell epitopes in HLA-DR4- and DR6-associated pemphigus vulgaris, *BMC bioinformatics* **7 Suppl 5**, S7.
- Tsubata, T.: 2017, B-cell tolerance and autoimmunity, *F1000Research* **6**, 391.

- Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., Koyasu, S., Nishikawa, T. und Amagai, M.: 2003, Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3, *Journal of Immunology* **170**(4), 2170–2178.
- Ueno, H.: 2016, T follicular helper cells in human autoimmunity, *Current opinion in immunology* **43**, 24–31.
- van Beek, N., Zillikens, D. und Schmidt, E.: 2019, Aktuelle therapie des pemphigus, *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **70**(4), 243–253.
- Vanikar, A. V., Modi, P. R., Patel, R. D., Kanodia, K. V., Shah, V. R., Trivedi, V. B. und Trivedi, H. L.: 2007, Hematopoietic stem cell transplantation in autoimmune diseases: the ahmedabad experience, *Transplantation proceedings* **39**(3), 703–708.
- Veldman, C., Höhne, A., Dieckmann, D., Schuler, G. und Hertl, M.: 2004, Type i regulatory t cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris, *The Journal of Immunology* **172**(10), 6468–6475.
- Veldman, C., Stauber, A., Wassmuth, R., Uter, W., Schuler, G. und Hertl, M.: 2003, Dichotomy of autoreactive th1 and th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (pv) and healthy carriers of pv-associated hla class ii alleles, *Journal of Immunology* **170**(1), 635–642.
- Victora, G. D. und Nussenzweig, M. C.: 2012, Germinal centers, *Annual review of immunology* **30**, 429–457.
- Vinuesa, C. G., Linterman, M. A., Di Yu und MacLennan, I. C. M.: 2016, Follicular helper t cells, *Annual review of immunology* **34**, 335–368.
- Vogelzang, A., McGuire, H. M., Di Yu, Sprent, J., Mackay, C. R. und King, C.: 2008, A fundamental role for interleukin-21 in the generation of t follicular helper cells, *Immunity* **29**(1), 127–137.
- Wang, J., Shan, Y., Jiang, Z., Feng, J., Li, C., Ma, L. und Jiang, Y.: 2013, High frequencies of activated b cells and t follicular helper cells are correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis, *Clinical and Experimental Immunology* **174**(2), 212–220.
- Wang, L., Zhao, P., Ma, L., Shan, Y., Jiang, Z., Wang, J. und Jiang, Y.: 2014, Increased interleukin 21 and follicular helper t-like cells and reduced interleukin 10+ b cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus, *The Journal of rheumatology* **41**(9), 1781–1792.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E. und Nussenzweig, M. C.: 2003, Predominant autoantibody production by early human b cell precursors, *Science* **301**(5638), 1374–1377.
- Weber, J. P., Fuhrmann, F., Feist, R. K., Lahmann, A., al Baz, M. S., Gentz, L.-J., Vu Van, D., Mages, H. W., Haftmann, C., Riedel, R., Grün, J. R., Schuh, W., Kroczeck, R. A., Radbruch, A., Mashreghi, M.-F. und Hutloff, A.: 2015, Icos maintains the t follicular helper cell phenotype by down-regulating krüppel-like factor 2, *The Journal of experimental medicine* **212**(2), 217–233.

- Werwitzke, S., Trick, D., Kamino, K., Matthias, T., Kniesch, K., Schlegelberger, B., Schmidt, R. E. und Witte, T.: 2005, Inhibition of lupus disease by anti-double-stranded dna antibodies of the igm isotype in the (nzb x nzw)f1 mouse, *Arthritis and rheumatism* **52**(11), 3629–3638.
- Wucherpfennig, K. W., Yu, B., Bhol, K., Monos, D. S., Argyris, E., Karr, R. W., Ahmed, A. R. und Strominger, J. L.: 1995, Structural basis for major histocompatibility complex (mhc)-linked susceptibility to autoimmunity: charged residues of a single mhc binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(25), 11935–11939.
- Xu, B., Wang, S., Zhou, M., Huang, Y., Fu, R., Guo, C., Chen, J., Zhao, J., Gaskin, F., Fu, S. M. und Yang, N.: 2017, The ratio of circulating follicular t helper cell to follicular t regulatory cell is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus, *Clinical Immunology* **183**, 46–53.
- Xu, R.-C., Zhu, H.-Q., Li, W.-P., Zhao, X.-Q., Yuan, H.-J., Zheng, J. und Pan, M.: 2013, The imbalance of th17 and regulatory t cells in pemphigus patients, *European journal of dermatology : EJD* **23**(6), 795–802.
- Xue, J., Su, W., Chen, Z., Ke, Y., Du, X. und Zhou, Q.: 2014, Overexpression of interleukin-23 and interleukin-17 in the lesion of pemphigus vulgaris: a preliminary study, *Mediators of Inflammation* **2014**, 463928.
- Yokoyama, T. und Amagai, M.: 2010, Immune dysregulation of pemphigus in humans and mice, *The Journal of Dermatology* **37**(3), 205–213.
- Yuan, H., Zhou, S., Liu, Z., Cong, W., Fei, X., Zeng, W., Zhu, H., Xu, R., Wang, Y., Zheng, J. und Pan, M.: 2017, Pivotal role of lesional and perilesional t/b lymphocytes in pemphigus pathogenesis, *The Journal of investigative dermatology* **137**(11), 2362–2370.
- Zhang, J., Jacobi, A. M., Mackay, M., Aranow, C., Wang, T., Chinnasamy, P. und Diamond, B.: 2008, Identification of dna-reactive b cells in patients with systemic lupus erythematosus, *Journal of immunological methods* **338**(1-2), 79–84.
- Zhang, X., Lindwall, E., Gauthier, C., Lyman, J., Spencer, N., Alarakhia, A., Fraser, A., Ing, S., Chen, M., Webb-Detiege, T., Zakem, J., Davis, W., Choi, Y. S. und Quinet, R.: 2015, Circulating cxcr5+cd4+helper t cells in systemic lupus erythematosus patients share phenotypic properties with germinal center follicular helper t cells and promote antibody production, *Lupus* **24**(9), 909–917.
- Zhou, S., Liu, Z., Yuan, H., Zhao, X., Zou, Y., Zheng, J. und Pan, M.: 2020, Autoreactive b cell differentiation in diffuse ectopic lymphoid-like structures of inflamed pemphigus lesions, *The Journal of investigative dermatology* **140**(2), 309–318.e8.
- Zhou, X., Fragala, M. S., McElhaney, J. E. und Kuchel, G. A.: 2010, Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research, *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **13**(5), 541–547.

7. Zusammenfassung

Pemphigus vulgaris (PV) ist eine antikörpervermittelte Autoimmunerkrankung, bei der es zur Bildung von Blasen und Erosionen an der Haut und den Schleimhäuten kommt. IgG-Autoantikörper gegen die desmosomalen Cadherine Desmoglein (Dsg)1 und 3 sind maßgeblich für die Entstehung des PV verantwortlich, indem sie einen Adhäsionsverlust der epidermalen Keratinozyten (Akantholyse) induzieren. Autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen sind entscheidend für die Aktivierung und Differenzierung von autoreaktiven B-Zellen und für die Induktion der Autoantikörperproduktion. Die genauen zellulären und humoralen Mechanismen, die zur Produktion von Autoantikörpern führen, sind in weiten Teilen noch nicht verstanden

Ziel dieser Arbeit war es daher, die adaptive Autoimmunantwort beim PV mit Hinblick auf die für die Induktion von Autoantikörpern relevanten Zytokine und die beteiligten T- und B-Zell-Subpopulationen näher zu untersuchen. Hierfür wurden in einer Querschnittsstudie Plasma und Immunzellen aus dem peripheren Blut von insgesamt 24 PV-Patienten untersucht.

Die Ergebnisse zeigten eine Rolle von Interleukin (IL)-21, ein pleiotropes Zytokin, welches die Differenzierung von B-Zellen in antikörpersezernierende Plasmazellen induzieren kann, in der Pathogenese des PV auf. Es konnten erhöhte Plasmaspiegel dieses Zytokins im Vergleich zu gesunden Kontrollen detektiert werden, wobei IL-21 vorrangig von CD4⁺ T-Zellen bei PV Patienten mit aktiver Erkrankung produziert wurde. IL-21-produzierende T-Zellen zeichneten sich in Teilen durch eine Koproduktion der Zytokine IL-4 und IL-17 aus, welches eine partielle Beteiligung von Th2- und Th17-Zellen an der IL-21-Produktion nahelegte. Nach in vitro Stimulation der peripheral blood mononuclear cells (PBMC) von Patienten mit Dsg3 konnte die Produktion von IL-21 erstmals bei autoreaktiven T-Zellen mittels des sensitiven ELISpot-Verfahrens nachgewiesen werden, wodurch die funktionelle Bedeutung dieses Zytokins in der Pathogenese zusätzlich unterstrichen wurde. Des Weiteren lagen zirkulierende T folliculäre Helfer (Tfh)-Zellen (definiert als CD4⁺CXCR5⁺ T-Zellen), die eine essentielle Funktion bei der Induktion einer antikörpervermittelten Immunantwort besitzen, im erhöhten Maße im peripheren Blut der Patienten vor. Hinsichtlich der funktionell relevanten kostimulatorischen Moleküle programmed cell death protein 1 (PD-1) und inducible T cell costimulator (ICOS) zeigten Tfh-Zellen von Patienten keine Unterschiede im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Darüber hinaus wurden niedrigfrequente autoreaktive B-Zellen mittels eines zuvor etablierten durchflusszytometrischen Testsystems durch die Markierung von rekombinanten Dsg3 mit Alexa Fluor 647 (Dsg3-AF647) im peripheren Blut der Patienten identifiziert und die Dsg3-spezifischen B-Zell-Subpopulationen unreif/naiv (CD19⁺CD27⁻), Gedächtnis B-Zellen (CD19⁺CD27⁺) und Plasmablasten (CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺) eingehend charakterisiert. Vor allem autoreaktive Gedächtnis B-Zellen konnten bei PV-Patienten in einem erhöhten Maße nachgewiesen werden, welches auf eine gestörte periphere Immuntoleranz an diesem Punkt der B-Zell-Entwicklung unter möglicher Beteiligung von autoreaktiven Tfh-Zellen hinwies. In einer Subgruppenanalyse von 5 PV-Patienten, die zuvor mit dem B-Zell-depletierenden anti-CD20-Antikörper Rituximab

behandelt wurden, zeigten sich erhöhte Frequenzen von Dsg3-spezifische Gedächtnis B-Zellen insbesondere in Phasen einer klinischen Remission, während dies bei einem Rezidiv nicht beobachtet werden konnten. Es wurde daher vermutet, dass die Aktivierung von autoreaktiven Gedächtnis B-Zellen einen Ausgangspunkt für die erneute Produktion von Autoantikörpern darstellen kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit identifizieren IL-21 und IL-21-produzierende T-Zellen als wichtige Bestandteile in der Pathogenese des PV. Zusammen mit der eingehenden Charakterisierung von Dsg3-spezifischen B-Zell-Subpopulation können diese Erkenntnisse die zukünftige Entwicklung neuer zielgerichteter Therapieformen zur Behandlung des PV ermöglichen.

8. Summary

Pemphigus vulgaris (PV) is an antibody-mediated autoimmune disease leading to blisters and erosions of the skin and mucous membranes. IgG autoantibodies against the desmosomal cadherins desmoglein (Dsg)1 and 3 are main drivers for the development of PV by inducing a loss of adhesion of epidermal keratinocytes (acantholysis). Autoreactive CD4⁺ T cells are crucial for the activation and differentiation of autoreactive B cells and for the induction of autoantibody production. Still, the exact cellular and humoral mechanisms leading to the production of autoantibodies are yet not fully understood.

The aim of this work was to investigate the adaptive autoimmune response in PV with regard to the relevant cytokines as well as T and B cell subpopulations involved in autoantibody induction. In a cross-sectional study plasma and immune cells from peripheral blood of a total of 24 PV patients were examined.

The results revealed a role of interleukin (IL)-21, a pleiotropic cytokine that can induce the differentiation of B cells into antibody-secreting plasma cells, in the pathogenesis of PV. Elevated plasma levels of this cytokine were detected compared to healthy controls with IL 21 being predominantly produced by CD4⁺ T cells in PV patients during active disease. IL-21-producing T cells were partially characterized by coproduction of the cytokines IL-4 and IL-17 suggesting a partial involvement of Th2 and Th17 cells in IL-21 production. After in vitro Dsg3-stimulation of patients' peripheral blood mononuclear cells with Dsg3, IL-21 production by autoreactive T cells could be detected for the first time using sensitive ELISPOT assay further underling the functional importance of this cytokine in disease pathogenesis.

In addition, circulating T follicular helper (Tfh) cells (defined as CD4⁺CXCR5⁺ T cells), being essential for the induction of an antibody-mediated immune response, were found to be increased in peripheral blood of the patients. Regarding the functionally relevant costimulatory molecules programmed cell death protein 1 (PD-1) and inducible T cell costimulator (ICOS), Tfh cells of patients showed no differences as compared to healthy controls.

Moreover, low-frequent autoreactive B cells were identified in peripheral blood of patients using an established flow cytometric test system by labelling recombinant Dsg3 with Alexa Fluor 647 (Dsg3-AF647) and Dsg3-specific B cell subpopulations immature/naïve (CD19⁺CD27⁻), memory B cells (CD19⁺CD27⁺) and plasmablasts (CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺) were characterized. Of note, increased autoreactive memory B cells could be detected in PV patients indicating an altered peripheral immune tolerance at this point of B cell development with possible involvement of autoreactive Tfh cells. In a subgroup analysis of 5 PV patients that had been previously treated with the B cell-depleting anti-CD20 antibody rituximab elevated frequencies of Dsg3-specific memory B cells were particularly found in phases of clinical remission, whereas this could not be observed during clinical relapse. It was speculated that the activation of autoreactive memory B cells may be the starting point for the production of new autoantibodies.

The results of the present study identify IL-21 and IL-21-producing T cells as important contributors to the pathogenesis of PV. Together with the in-depth characterization of Dsg3-specific B cell subpopulations these findings may enable the future development of new targeted therapies for the treatment of PV.

9. Anhang

9.1 Tabellen

Tab. 1: Klinik, Autoantikörper und Therapie der in dieser Arbeit untersuchten Pemphigus vulgaris – Patienten

A, Alter; AZA, Azathioprin; Dsg, Desmoglein; G, Geschlecht; m, männlich; MMF, Mycophenolat Mofetil; Pat, Patient; PV, Pemphigus vulgaris; w, weiblich;

Pat.	G.	A.	Klinische Manifestation		Autoantikörper ¹		Therapie zur Zeit der Blutentnahme	Rituximab-Therapie ²
			Haut	Schleimhaut	Dsg1	Dsg3		
Rezidiv								
PV1	m	50	Hals, Kopf, Rücken	Mundschleimhaut	143	422	40mg/Tag Prednisolon	22
PV2	w	69	Körperstamm, Extremitäten	Mundschleimhaut	1556	1759	10mg/Tag Prednisolon 2g/Tag MMF	94
PV3	m	43	Kopfhaut, Körperstamm, Extremitäten	/	1582	75	40mg/Tag Prednisolon	35
PV4	w	39	Kopfhaut, Körperstamm, Füße	Mund- und Nasenschleimhaut	145	330	30mg/Tag Prednisolon 150mg/Tag AZA	49
PV5	w	27	/	Mundschleimhaut	0	40	/	/
PV6	m	25	/	Mundschleimhaut	2	35	5mg/Tag Prednisolon 150mg/Tag AZA	/
PV7	w	44	Hals	Mundschleimhaut	7	200	10mg/Tag Prednisolon	/
PV8	w	21	Kopfhaut, Gesicht	Mund- und Genitalschleimhaut	122	1445	20mg/Tag Prednisolon 2g/Tag MMF	/
PV9	m	61	Kopfhaut	/	3	5619	20mg/Tag Prednisolon 150mg/Tag AZA	/

¹Serumkonzentration von anti-Dsg1- und anti-Dsg3-IgG [relative Einheiten / ml]

²Monate seit letzter B-Zell-Depletion mit Rituximab (anti-CD20-Antikörper)

Tab. 2: Klinik, Autoantikörper und Therapie der in dieser Arbeit untersuchten Pemphigus vulgaris – Patienten mit remittierenden Krankheitsstatus

A, Alter; AZA, Azathioprin; Dsg, Desmoglein; G, Geschlecht; m, männlich; MMF, Mycophenolat Mofetil; Pat, Patient; PV, Pemphigus vulgaris; w, weiblich;

Pat.	G.	A.	Klinische Manifestation		Autoantikörper ¹		Therapie zur Zeit der Blutentnahme	Rituximab-Therapie ²
			Haut	Schleimhaut	Dsg1	Dsg3		
Partielle Remission								
PV10	w	52	/	Mundschleimhaut	6	135	3,75mg/Tag Prednisolon	/
PV11	w	31	/	Mundschleimhaut	7	171	50mg/Tag Dapson	/
PV12	m	59	/	Mundschleimhaut	0	606	/	27
PV13	w	40	Körperstamm	/	340	175	10mg/Tag Prednisolon	18
PV14	w	55	/	Mundschleimhaut	0	51	/	/
PV15	w	52	/	Mundschleimhaut	5	72	10mg/Tag Prednisolon	/
PV16	m	45	/	Mund- und Nasenschleimhaut	0	72	20mg/Tag Prednisolon 2g/Tag MMF	/
PV17	w	54	Kopfhaut, Körperstamm, Beine	/	182	121	20mg/Tag Prednisolon 150mg/Tag AZA	9
PV18	w	31	/	Mundschleimhaut	2	529	50mg/ Tag Dapson	/
PV19	m	51	/	Mundschleimhaut	94	281	5mg/Tag Prednisolon	22
PV20	w	79	/	/	7	0	15mg/Tag 1g/Tag MMF	/

komplette Remission

PV21	w	58	/	/	9	0	/	95
PV22	w	73	/	/	0	176	/	/
PV23	m	54	/	/	0	0	/	25
PV24	w	32	/	/	0	94	5mg/Tag Prednisolon	/

¹Serumkonzentration von anti-Dsg1- und anti-Dsg3-IgG [relative Einheiten / ml]²Monate seit letzter B-Zell-Depletion mit Rituximab (anti-CD20-Antikörper)

9.2 Schriftenverzeichnis

Originalarbeiten

Cosgarea, R⁺, **Pollmann, R⁺**, Sharif, J., Schmidt, T., Stein, R., Bodea, A., Ausschil, T., Sculean A., Eming R., Greene B., Hertl M., Arweiler, N. (2020). Photodynamic therapy in oral lichen planus: A prospective case-controlled pilot study. *Scientific reports*, 10(1), 1667. *geteilte Erstauterschaft

Pollmann, R., Walter, E., Schmidt, T., Waschke, J., Hertl, M., Möbs, C., & Eming, R. (2019). Identification of Autoreactive B cell Subpopulations in Peripheral Blood of Autoimmune Patients with Pemphigus vulgaris. *Frontiers In Immunology*, 10, 1375.

Solimani, F⁺, **Pollmann, R⁺**, Schmidt, T., Schmidt, A., Savai, R., Zheng, X., Savai, R., Mühlenbein, S., Pickert, J., Eubel, V., Möbs, C., Eming, R. & Hertl, M. (2019). Therapeutic targeting of Th17/Tc17 cells leads to clinical improvement of lichen planus. *Frontiers in Immunology*, 10, 1808. *geteilte Erstauterschaft

Solimani, F., Maglie, R., **Pollmann, R.**, Schmidt, T., Schmidt, A., Ishii, N., Tackenberg, B., Kirschbaum A., Didona D., Pickert J., Eming R., Hashimoto, T., & Hertl M. (2019). Thymoma-associated paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome—from pemphigus to lichenoid dermatitis. *Frontiers in Immunology*, 10, 1413.

Beckert, B., Panico, F., **Pollmann, R.**, Eming, R., Banning, A., & Tikkanen, R. (2019). Immortalized Human hTert/KER-CT Keratinocytes a Model System for Research on Desmosomal Adhesion and Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3113.

Walter, E., Vielmuth, F., Wanuske, M. T., Seifert, M., **Pollmann, R.**, Eming, R., & Waschke, J. (2019). Role of Dsg1-and Dsg3-mediated signaling in pemphigus autoantibody-induced loss of keratinocyte cohesion. *Frontiers in Immunology*, 10, 1128.

Solimani, F., **Pollmann, R.**, Ishii, N., Eming, R., Hashimoto, T., Schmidt, T., & Hertl, M. (2019). Diagnosis of anti-laminin γ -1 pemphigoid by immunoblot analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 33(4), 735-741.

Bender, A., Fix, C., Eubel, V., Eming, R., **Pollmann, R.**, Schmidt, T., & Hertl, M. (2018). Adjuvant high-dose intravenous immunoglobulins for recalcitrant erosive oral lichen planus: mixed clinical responses. *European Journal of Dermatology*, 28(4), 496-501.

Schmidt, T., Solimani, F., **Pollmann, R.**, Stein, R., Schmidt, A., Stulberg, I., Kühn K., Eming R., Eubel V., Kind P., & Arweiler, N. (2018). TH1/TH17 cell recognition of desmoglein 3 and bullous pemphigoid antigen 180 in patients with lichen planus. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(2), 669-672.

Hennerici, T⁺, **Pollmann, R⁺**, Schmidt, T., Seipelt, M., Tackenberg, B., Möbs, C., Ghoreschi, K., Hertl M., & Eming, R. (2016). Increased frequency of T follicular helper cells and elevated interleukin-27 plasma levels in patients with pemphigus. *PloS one*, 11(2), e0148919. *geteilte Erstautorschaft

Übersichtsarbeiten

Pollmann, R., Schmidt, T., Eming, R., & Hertl, M. (2018). Pemphigus: a comprehensive review on pathogenesis, clinical presentation and novel therapeutic approaches. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 54(1), 1-25.

Pollmann, R., & Eming, R. (2017). Research techniques made simple: mouse models of autoimmune blistering diseases. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(1), e1-e6.

Publizierte Abstracts und Kongressbeiträge

Pollmann, R., Schmidt T., Möbs C., Seipelt M., Tackenberg B., Pfützner, W., Hertl, M., Ghoreschi K., & Eming, R. (2015). Characterization of circulating CD4+ CXCR5+ follicular helper T cells in pemphigus vulgaris. *Experimental Dermatology* 24, e1-e50.

Pollmann, R., Hennerici, T., Schmidt T., Seipelt M., Tackenberg, B., Hertl, M., & Eming, R. (2015). IL-27 in pemphigus vulgaris: a potential role in disease pathogenesis by promoting IL-21 producing T follicular helper cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 135, S2:s1-s17.

Pollmann, R., Schmidt T., Möbs C., Seipelt M., Tackenberg B., Pfützner, W., Hertl, M., & Eming, R. (2016). Characterization of IL-21-producing T cells in pemphigus vulgaris. *Experimental Dermatology* 25, e1–e54.

Pollmann, R., Schmidt T., Möbs C., Pfützner, W., Hertl, M., & Eming, R. (2017). Analysis of autoreactive desmogleins 3-specific B cells in patients with pemphigus vulgaris. *Experimental Dermatology* 26, e1–e115.

Pollmann, R., Schmidt T., Möbs C., Pfützner, W., Hertl, M., & Eming, R. (2018). Identification of autoreactive B cell subpopulations in peripheral blood of pemphigus vulgaris patients. *Experimental Dermatology* 27, e2–e106.

Pollmann, R., Solimani, F., Schmidt T., Didona, D., Eming, R., & Hertl, M. (2019). Monitoring of autoreactive T cells in patients with pemphigus. *Experimental Dermatology* 28, e2–e122.

Korff, V., Scarsella, L., Didona, D., Wienzek-Lischka, S., Göbel, M., Solimani, F., Di Zenzo, G., Fleischer, S., Eming, R., Hertl, M., & **Pollmann, R.** (2020). Detection and monitoring of autoreactive T cell responses against desmogleins 1 and 3 in patients with pemphigus. *Journal of Investigative Dermatology*, 139, s215-s352.

9.3 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Herren und Damen

Professoren, Doktoren und Dozenten

in Marburg:

Adam, Bauer, Becker, Brehm, Bremmer, Daut, Dietrich, Eickmann, Elsässer, Eming, Feuser, Fritz, Garn, Grzeschik, Hertl, Hoyer, Huber, Jakob, Käuser, Klenk, Lill, Lohoff, Lohöfer, Maisner, Mühlenhoff, Müller, Müller-Brüsselbach, Oeffner, Pfefferle, Plant, Preisig-Müller, Shams-Eldin, Schäfer, Schnare, Schmeck, Schütz, Slenczka, Steinhoff, Suske, Višekruna, Weber, Weirich, Westermann, Wrocklage, Yu, Zemlin

9.4 Danksagung

Für meine Eltern
Für meine Geschwister
Für Melanie, Ilai und Lilja

An allererster Stelle möchte ich mich bei den Patienten des Universitätsklinikums Marburg und Gießen bedanken, die durch ihre freiwillige Blutspende diese Arbeit erst ermöglicht haben. Zudem danke ich den Ärzten und dem Pflegepersonal des stationären sowie ambulanten Bereichs für die Hilfe bei der Rekrutierung der Patienten und der Durchführung der Blutentnahmen.

Daneben gilt mein Dank den vielen Personen, die mich auf dem dann doch langen Weg meiner Promotion begleitet und unterstützt haben. Nachfolgend möchte ich einige hiervon auflisten, mit der Bitte um Nachsicht, falls der eine oder andere namentlich unerwähnt bleibt.

Für die Möglichkeit meine Doktorarbeit über das spannende Thema der Autoimmunität an der Klinik für Dermatologie und Allergologie in Marburg durchzuführen, möchte ich mich beim Herrn Prof. Dr. Michael Hertl bedanken. Sein Zuspruch und Antrieb während des Abschlusses meiner Promotionsarbeit waren mir eine große Hilfe.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Rüdiger Eming für die Betreuung meine Doktorarbeit, die vielen hilfreichen Gespräche während und auch abseits des Arbeitstages und allgemein für die Unterstützung auch bei schwierigen Phasen. Zudem danke ich Herrn Dr. Christian Möbs und Herrn Dr. Thomas Schmidt für die zahlreichen hilfreichen Vorschläge und Anmerkungen bei der Durchführung der Experimente, der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse sowie die Unterstützung beim Anfertigen und der Korrektur der wissenschaftlichen Publikationen. Ein weiterer Dank geht an die weiteren noch nicht erwähnten Mitarbeiter des Forschungslabors Carolin Baum, Suyu Choi, Christoph Hudemann, Imke Eichenhauer, Andrea Gerber, Tina Hennerici, Elke Hermann, Michèle Rauber, Mathias Schuppe und Manuel Schulze-Dasbeck.

Meinen Brüdern und meinen Eltern danke ich für Ihre Zeit, die sie sich für die Korrektur genommen haben, die große Unterstützung in verschiedenster Art und Weise und die vielen aufbauenden Gespräche.

Zuletzt möchte ich einen großen Dank meiner Frau Melanie aussprechen. Ohne ihre Geduld, die sicherlich teilweise auch von mir stark überstrapaziert wurde, ihr Verständnis und ihre Unterstützung hätte ich diese Arbeit gerade in den letzten Jahren mit zwei kleinen Kindern, die es neben den beruflichen Aufgaben auch zu versorgen galt, nicht vollenden können.